

**黒麹菌の形質転換系の構築と
新規薬剤耐性マーカ―遺伝子の開発**

渡嘉敷 直杏

2021

目次

第 1 章 序論	4
黒麹菌について	4
黒麹菌の形質転換系と細胞壁多糖である α -1,3-glucan の関係	5
糸状菌と薬剤耐性マーカー遺伝子について	7
研究目的と本論文の構成	10
第 2 章 実験操作および試薬類の調製方法	11
供試菌株	11
培地（麹菌用）	11
プロトプラスト化用試薬	14
麹菌トータル DNA 調製用試薬	16
麹菌のプロトプラスト化	17
プロトプラストセルカウント	17
<i>E. coli</i> 形質転換法（ヒートショック法）	17
プラスミド DNA 回収 (LaboPass Plasmid Mini Plasmid DNA Purification Kit)	18
アガロースゲル電気泳動	18
プロトプラスト-PEG 法による形質転換（野生株）	19
プロトプラスト-PEG 法による形質転換 (Δ <i>agsE</i>)	19
PCR による pPTRII プラスミド保持の確認	20
相同組換え体のコロニー PCR による確認	21
第 3 章 黒麹菌の細胞壁多糖である α-1,3-glucan を合成する <i>agsE</i> がプロトプラスト 形成に与える影響	22
第 1 節 緒言	22
第 2 節 材料および実験方法	24

第3節 結果と考察	33
第4節 小括	50
第4章 薬剤耐性マーカー遺伝子 <i>itrA</i> の構築.....	51
第1節 緒言	51
第2節 材料および実験方法	53
第3節 結果と考察	60
第5節 小括	72
総括	73
引用文献.....	77
謝辞	84

第1章 序論

黒麹菌について

麹菌は糸状菌の一種であり、我が国において 1000 年以上、清酒、醤油、味噌などの伝統食品、沖縄では泡盛など、様々な発酵食品の製造に用いられてきた。これらの食品は麹菌の生産する代表的な酵素であるアミラーゼ、プロテアーゼ等の酵素により原料のデンプンやタンパク質の分解に用いられ、また、これらの酵素によって生じる独特の風味が好まれてきた。身近な食品以外にも、麹菌は医薬品、酵素等の有用物質生産にも利用されており、麹菌関連産業の規模は世界で 1 兆円とされる(1)。これらのことから分かるように、麹菌と人は深く関わってきた歴史があり、食品利用における安全性も高く、国際的にも GRAS (generally recognized as safe) として認知されている。2005 年には黄麹菌のゲノム情報解析が完了し (2)、遺伝子レベルにおいてもアフラトキシンなどのカビ毒の生産に関与する生合成系の欠失が確認されている (3,4)。本研究で扱う黒麹菌は *Aspergillus luchuensis* に分類され、沖縄を中心とする泡盛醸造に伝統的に用いられる他、近年九州の一部の焼酎醸造の現場でも用いられている。ドラフトゲノム解析も 2016 年に完了し、その結果からオクラトキシン (OTA)、フモニシン合成遺伝子を欠失していることが確認された (5)。黒麹菌はもともと 1901 年に乾によって報告された *Aspergillus luchuensis* をはじめとし、*A. inui*、*A. usami*、*A. batatae*、*A. aureus*、*A. saitoi*、*A. nakazawai*、*A. ficuum*、*A. phoenicis*、

A. foetidus、*A. niger* などと呼ばれ、分類上混乱していたが、その性状、ゲノム情報から毒素非生産の *A. luchuensis* タイプと *A. niger* タイプに再分類された (6)。

清酒醸造などに用いられる黄麹菌 *Aspergillus oryzae* と違い、黒麹菌はクエン酸産生能を有し、醸造中の醪の pH を低下させ腐造を防止するほか、特徴的である黒い分生子を有する。また、麹菌の作りだす糖化酵素においても差が見られ、*A. oryzae* の産生するアミラーゼは中性域でのみ働くのに対し、*A. luchuensis* のアミラーゼは中性から酸性域まで活性を示す。この特徴的な性質から新規な耐酸性をもつ糖質関連酵素、タンパク質分解酵素、脂質分解酵素などの発見が期待されている。しかしながら、多くの研究者によってその生理機能や遺伝子の働きが盛んに研究されている *A. oryzae* とは異なり、*A. luchuensis* を、研究対象生物とした報告は少ない。

黒麹菌の形質転換系と細胞壁多糖である α -1,3-glucan の関係

A. oryzae と比較して、黒麹菌 *A. luchuensis* はゲノム解読及び公開が遅れた事にも起因するが、未だ多くの機能未知遺伝子が存在する。*A. oryzae* は、1990 年頃よりプロトプラスト-PEG 法を用いた形質転換法によって、日本を中心として国内大学、民間研究所及び国立研究開発法人において、転写因子を中心とした遺伝子破壊株ライブラリやプロテアーゼ高発現株ライブラリの造成が行われ、諸性質などが明らかにされてきた。一方、*A. luchuensis* においても *A. oryzae* と同様な手法をもって、形質転換、遺伝子破壊などが出来ると期待されたが、*A. oryzae* と同じプロトプラスト-PEG 法での形質転換が困難であった (9)。そのた

め、黒麹菌の遺伝子組換えを伴った機能の解析といった研究には遅れが生じている。近年、*A. luchuensis* のプロトプラスト-PEG 法に依らない、アグロバクテリウム法による形質転換法なども考案されているが (10)、その手順は複雑であり、プロトプラスト-PEG 法と比較すると用意すべき試薬も多く、また、宿主の *A. luchuensis* に感染できるアグロバクテリウム株の選定など、アグロバクテリウム法による形質転換系を確立するのは、簡便とは言い難い。一方、*A. oryzae* における Cre-loxP system を用いたマーカー遺伝子回収法において、プロトプラスト細胞に直接、Cre 酵素を導入することで、簡便に Cre-loxP system を用いたマーカー遺伝子回収法の報告 (11)や *Penicillium chrysogenum* における CRISPR-Cas9 ribonucleoproteins をプロトプラスト細胞に直接導入することで、CRISPR/Cas9 を用いた簡便なゲノム編集法が報告されている (12)。このように、プロトプラスト化処理を行うプロトプラスト-PEG 法は、一般的な外来 DNA による形質転換法の確立から、酵素タンパク質導入による新規な形質転換をも可能とし、黒麹菌の分子生物学的研究を進める上で非常に重要な位置づけとなっている。

本研究室では、過去数年間、*A. oryzae* と *A. luchuensis* の細胞壁多糖の組成を調べる他、*A. luchuensis* のプロトプラスト化を行うための検討を行ってきたが、未だプロトプラスト化および、プロトプラスト-PEG 法による形質転換法は確立されていなかった。そこで本研究では、形質転換に必要な *A. luchuensis* のプロトプラストを調製することを当初の目標とした。*A. luchuensis* の標準株 NBRC4314 株を供試菌株として用い、培地組成条件、培養条件等がプロトプラ

スト化にどのような影響を及ぼすのか定量的に観察し、効率的なプロトプラスト調製条件を決定した。その結果、最少培地で静置培養した菌体を用い、市販糸状菌細胞壁溶解酵素 Yatalase に加え、 α -1,3-glucanase を用いることで、 2×10^6 cells / mL のプロトプラストを得ることに成功した。更に、これらプロトプラストを用いて、ピリチアミン耐性遺伝子を用いた形質転換が可能であることを示した。続けて、 α -1,3-glucanase がプロトプラスト化に有効であることから、 α -1,3-glucan 合成酵素 (Ags) がプロトプラスト形成阻害へ関与するのか検討を行った。その結果、糸状菌のモデル生物のひとつである *Aspergillus nidulans* において細胞壁 α -1,3-glucan 合成に関与している AgsB のホモログである黒麹菌 AgsE がプロトプラスト化形成阻害に関与していることを *agsE* 遺伝子破壊株 (Δ *agsE*) を用いて明らかにした (13)。また、*agsE* 遺伝子破壊株のプロトプラストを用いた形質転換が可能であることが示され、更に CRISPR-Cas9 ribonucleoproteins をプロトプラスト細胞に直接導入することで、CRISPR/Cas9 を用いたゲノム編集が可能であることを示唆するデータが得られた。本研究の結果は、多くの研究者が *A. luchuensis* の分子生物学的研究に参入しやすくなることを意味し、今後、*A. luchuensis* 研究が大きく発展することが期待される。

糸状菌と薬剤耐性マーカー遺伝子について

黄麹菌を始めとする *Aspergillus* 属糸状菌は真核生物であり、原核生物である大腸菌などの形質転換実験で用いられる多くの種類のセレクション用薬剤に対して強い抵抗性を持っている。このような特徴を持つことから、遺伝子組換え

などに用いられる実験室株については栄養要求性を指標とした選抜が可能な宿主の育種が成されていることが多く、同じ実験系を醸造株を始めとする野生株へそのまま適用することが難しいとされている。本研究における黒麹菌も同様に形質転換系を構築することが難しかったが、ヒト DNA ligase IV ホモログである *ligD* の欠失により、相同組換え効率が劇的に上昇する $\Delta ligD$ 株 (9), 及び $\Delta agsE$ 株の取得が行われ、形質転換実験を行う基盤ができた。特に、 $\Delta agsE$ 株において、*Aspergillus* 属糸状菌における一般的な形質転換プロトコールであるプロトプラスト-PEG 法を簡便に行うことができるようになった。しかしながら、本論文において利用するハイグロマイシン、ピリチアミンといった薬剤耐性マーカーを利用した上で $\Delta agsE$ 株を構築しているため、さらなる破壊株の取得や遺伝子挿入の際に再び同じ薬剤マーカー遺伝子は利用できない。このようなマーカー遺伝子が利用できなくなる問題は黒麹菌のみで起こり得る問題ではない。Gardiner らによる *Fusarium graminearum* の CRISPR/Cas9 によるゲノム編集の結果(14)からは、効率的なゲノム編集においてもセレクション（選択圧）が重要であるとの報告がある。多数の遺伝子導入や欠失においてマーカー遺伝子の選択肢があることはマーカーリサイクル技術とともに必要な実験基盤であり、特に多くの抗生物質への抵抗性をもつ糸状菌においては重要である。そこで、本研究では糸状菌の生育阻害化合物とその耐性遺伝子の組み合わせによって新規マーカー遺伝子の創出を試みた。この新規マーカー遺伝子はピリチアミン耐性遺伝子のように野生株でも利用することができ、かつ安価な化合物の利用を検討した。本研究では真菌類特異的に存在するエルゴステロール合成経路

に着目し、この系を阻害することで知られるアゾール化合物の一種であるイト
ラコナゾールとその耐性化に着目し、黒麹菌由来の耐性マーカー遺伝子を開発
を目指した。

研究目的と本論文の構成

本研究では黒麹菌の形質転換系の構築を試みた。黄麹菌などで採用されている従来の方法では黒麹菌のプロトプラスト形成が困難であり、黒麹菌のプロトプラスト形成効率を培養条件と細胞壁溶解酵素の検討を行なって最適な条件を突き止めた。プロトプラスト形成阻害の要因として α -1,3-glucan が示唆された為、 α -1,3-glucan 合成遺伝子 (*agsE*) の同定と破壊株の性質の確認、プロトプラスト-PEG 法による形質転換体の取得を行った。次に、黒麹菌のみならず、幅広い糸状菌における共通の問題である薬剤耐性マーカー遺伝子の少なさを解決するためにマーカー遺伝子の開発を第二の目的とした。マーカーの作出は黒麹菌、黄麹菌の両方で利用可能なものを作り出すことで、今後の実験を円滑に進めるためのものとした。

第 2 章 実験操作および試薬類の調製方法

本章は第 3 章以降の各実験の操作方法および調製方法をまとめて記載する。

供試菌株

黒麹菌のゲノム解析が行われた *Aspergillus luchuensis* RIB2604 (NBRC4314) 株および、RIB2604 株を親株とし、非相同末端結合修復系に關与する *ligD* 遺伝子を欠失させた株である $\Delta ligD$ 株を主にプロトプラスト形成能の評価、および形質転換の為の供試菌株として使用した。*Escherichia coli* DH5a 株を様々なプラスミドの増幅およびクローニングの用途に使用した。*Agrobacterium tumefaciens* C58C1 株をアグロバクテリウム法による黒麹菌の形質転換に用いた。

培地（麹菌用）

麹菌の継代、分生子回収のための前培養に PD 寒天培地を用いた。

・ PD 寒天培地	(/1 L)	最終濃度
Potato dextrose agar	39 g	3.9%
DW	Up to 1 L	

PD 寒天培地の調製には EMD Millipore Potato dextrose agar (Cat. No. 100804) または BD Difco Dehydrated Culture Media: Potato Dextrose Agar (Cat. No. 213400) を用いた。

麴菌のトータル DNA 抽出（ゲノム抽出）のため、形質転換のための前培養の用途で DPY 培地を用いた。

・ DPY 液体培地	(/100 mL)	最終濃度
Dextrin	2 g	2%
Polypeptone	1 g	1%
Yeast extract	0.5 g	0.5%
KH ₂ PO ₄	0.5 g	0.5%
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.05 g	0.05%
DW	Up to 100 mL	

麴菌継代、プロトプラスト化前の前培養など、様々な用途に CD 培地を用いた。

・ Czapek-Dox 培地	(/100 mL)	最終濃度
NaNO ₃	0.3 g	0.3%
KCl	0.2 g	0.2%
KH ₂ PO ₄	0.1 g	0.1%
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.05 g	0.05%
2% FeSO ₄ ·7H ₂ O	100 μL	0.002%
Glucose	2 g	2%
DW	Up to 100 mL	

pH 5.5 に NaOH で調整して利用した。

麴菌のピリチアミンセレクションのために M+Sor+PT 培地を利用した。

・ M+Sor+PT	(/100 mL)	最終濃度
NH ₄ Cl	0.2 g	0.2%
(NH ₄) ₂ SO ₄	0.1 g	0.1%
KCl	0.05 g	0.05%
NaCl	0.05 g	0.05%
KH ₂ PO ₄	0.1 g	0.1%
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.05 g	0.05%
2% FeSO ₄ ·7H ₂ O	100 μL	0.02%
Glucose	2 g	2%
Sorbitol	21.86 g	1.2 M
DW	Up to 100 mL	

pH 5.5 に NaOH で調整した。下層培地として用いる場合には Agar を終濃度 1.5%、Top Agar（重層用）として用いる場合には Agar を終濃度 0.8% 上記組成に加えて添加した。下層培地調製の際にはオートクレーブ後のシャーレに注ぐ直前に Pyrithiamine hydrobromide（Sigma-Aldrich）を 0.1 mg/L の濃度になるよう添加した。Top Agar はオートクレーブ後、室温にて保管した。使用前にレンジで溶かし、45°C のウォーターバス内で重層直前まで保温し、重層時に Pyrithiamine hydrobromide を 0.1 mg/L の濃度になるよう添加して用いた。

プロトプラスト化用試薬

プロトプラスト-PEG 法による形質転換およびプロトプラストの生成効率を評価する目的、およびプロトプラストの濃度調整に使用した。

・ Stabilization buffer (TF Solution 0)	(/100 mL)	最終濃度
Maleic acid	1.16 g	50 mM
DW	Up to 100 mL	

NaOH で pH 5.5 に調整し用いた。

・ TF Solution 1 (TF Sol 1)	(/100 mL)	最終濃度
Yatalase	0.1 g	1%
(NH ₄) ₂ SO ₄	0.79 g	0.6 M
TF Solution 0	Up to 10 mL	

使用前にフィルター滅菌 (0.45 μm フィルター) し用いた。

・ TF Solution 2 (TF Sol 2)	(/400 mL)	最終濃度
Sorbitol (Glucitol)	87.4 g	1.2 M
CaCl ₂ ·2H ₂ O	2.94 g	50 mM
NaCl	0.82 g	35 mM
1 M Tris-HCl (pH 7.5)	4 mL	1%
DW	Up to 400 mL	

• TF Solution 3 (TF Sol 3)	(/200 mL)	最終濃度
PEG 4000	120 g	60%
CaCl ₂ ·2H ₂ O	1.47 g	50 mM
1 M Tris-HCl (pH 7.5)	2 mL	10 mM
DW	Up to 200 mL	

麹菌トータル DNA 調製用試薬

麹菌からトータル DNA を調製し PCR 用のテンプレートなどに使用した。

・ GE Solution	(/10 mL)
0.5 M EDTA (pH 8.0)	1 mL
10% SDS	0.5 mL
50 mg/mL Proteinsas K in ddH2O	20 μ L
DW	Up to 10 mL
<hr/>	
・ エタノール沈殿 Solution	
100% エタノール	10 mL
3 M 酢酸ナトリウム (pH 5.2)	0.4 mL
<hr/>	
・ RNase TE	
TE (pH 8.0)	2 mL
1 mg/mL RNase A 溶液	40 μ L

麹菌ゲノム DNA 調製操作方法

DPY 培地で 18 時間振とう培養した菌体を 0.3 g (菌体湿重量) 用意し、液体窒素で凍結後にマルチビーズショッカーを用いて破碎した。これをフェノール・クロロホルム法に従い除タンパクし、水層をエタノール沈殿し、ゲノム DNA を精製した。

麹菌のプロトプラスト化

100 mL の液体培地に 10^7 個の分生子を植菌し、150 rpm で 1 晩 (18 h) 30°C で振とう培養した麹菌の菌体をミラクロス上に集め、蒸留水で集洗菌した後、水気を切って 5 mL TF Sol 1 に加え、30°C で菌体がゆれる程度 (55 strokes/min.) に振とうしながら反応させた。菌体湿重量あたりのプロトプラスト数をカウントする場合のみ、TF Sol 1 と反応させる直前に菌体の重量を測定した。

プロトプラストセルカウント

プロトプラスト反応液 (菌体と TF Sol 1) から 1 mL 分取し、ミラクロスでろ過後、等量 (1 mL) の TF Sol 2 を加え混和、2500 rpm、8 分遠心し、上清をデカンテーションにて除去した。沈殿を再び TF Sol 2 に再懸濁し、トーマ式血球計算盤を用いてプロトプラスト数の測定を行った。ここから求められるプロトプラスト数より反応液 (TF Sol 1) 中のプロトプラスト濃度 [cells/mL] および菌体湿重量 1 g あたり生成プロトプラスト濃度 [cells/mL·g] を求めた。

E. coli 形質転換法 (ヒートショック法)

-80°C で保管していた *Escherichia coli* DH5a のコンピテントセルをあらかじめ氷上融解し、目的の DNA を約 10 pg 程度加え、さらに 5 分間氷上で放置した。50 秒間、42°C の湯の中で保温し、直ちに氷上に移し、5 分間放置した。水または SOC で 10 倍以上に希釈し、必要に応じて 1 時間回復培養した後、選択培地にスプレッドした。

プラスミド DNA 回収 (LaboPass Plasmid Mini Plasmid DNA Purification Kit)

Buffer 類はすべて Kit に付属のものを用いた。ヒートショック法で形質転換した *E. coli* を 5 mL の LB 培地で 18 時間 (overnight) 培養した。培養液を 5 mL チューブに移し、遠心 (14000 rpm、5 分) し、デカンテーションによって培地を取り除き S1 Buffer を 250 μ L 加え懸濁させた。1.5 mL チューブに移し、S2 Buffer を 250 μ L 加え転倒混和後、S3 Buffer を 350 μ L 加え転倒混する。14000 rpm で 10 分間遠心し、上清のみをスピncラムに移し、14000 rpm で 1 分間遠心した。コレクションカラム内の液を捨て、PW Buffer を 750 μ L 加え、14000 rpm で 1 分間遠心した。カラム内の液を捨て、14000 rpm で再び 1 分間遠心し、カラムを取り外し、新しい 1.5 mL チューブにセットした。EB Buffer を 50 μ L 加え、1 分間放置した後、14000 rpm で 1 分間遠心し、プラスミド DNA を回収した。

アガロースゲル電気泳動

1 \times TAE バッファー (40 mM Tris, 20 mM Acetic Acid, 1mM EDTA) に対して終濃度 0.8% (w/v) となるようアガロースを加え、アガロース粉末が完全に見えなくなるまで電子レンジで加熱し、溶解させた。アガロース溶解溶液を電気泳動用の型に流し込み、固まるまで静置した。完成したゲルを目的サンプルの電気泳動に用いた。

プロトプラスト-PEG 法による形質転換（野生株）

黒麹菌の分生子を Czapek-Dox 培地 (*ptrA* によるセレクション時) に 10^4 cells/ml になるように植菌し、 30°C で 18 時間静置にて前培養した。培養後得られた菌体を滅菌蒸留水で洗菌し、TF Sol 1 と 90 分間、 30°C で振とうさせながら反応させた。反応後、滅菌したミラクロスでろ過した反応液に等量の TF Sol 2 を加え、転倒混和したのち 2500 rpm、8 分、 4°C で遠心 (ブレーキオフ) した。遠心後、上清を取り除き、再度 500 μL の TF Sol 2 に懸濁し、セルカウントを行った。懸濁液をプロトプラスト濃度が 10^6 protoplasts/mL となるよう TF Sol 2 で希釈し、このうち 400 μL を別のチューブに取り分け、形質転換に用いる DNA を 5 μg (10 μL) 加え、30 分間氷冷した。氷冷後、1350 μL の TF Sol 3 を 3 回に分けて加え、プロトプラストと TF Sol 3 が均一になるよう静かに混和し、室温で 20 分間静置した。その後、5 mL の TF Sol 2 を加え、混和後、2500 rpm、8 分、 4°C で遠心 (ブレーキオフ) し、上清を除去後、500 μL TF Sol 2 に懸濁した後、Top Agar と共に選択培地に重層した。

プロトプラスト-PEG 法による形質転換 (ΔagsE)

黒麹菌の分生子を DPY 培地に 10^4 cells/ml になるように植菌し、 30°C 、150 rpm で 18 時間振とう培養した菌体を準備した。この菌体を滅菌蒸留水で洗菌し、TF Sol 1 の入った L 字管に移しプロトプラスト化処理を行った。菌体は 30°C で 2-3 時間揺らしながら TF Sol 1 と反応させた後、滅菌したミラクロスを使って菌糸とプロトプラストに分けた。プロトプラスト液に 10 mL (等量) の TF Sol

2 を加え、軽く混和し、2500 rpm、8 分、4°Cで遠心（ブレーキオフ）した。遠心後にデカンテーションで上清をすて、5 mL の TF Sol 2 にペレットを懸濁させ、再び 2500 rpm、8 分、4°Cで遠心（ブレーキオフ）した。上清をデカンテーションで除去し、5 mL の TF Sol 2 にプロトプラストを懸濁させた後、この液のプロトプラスト濃度をトーマ血球計算盤で求めた。再度、2500 rpm、8 分、4°Cで遠心（ブレーキオフ）し、プロトプラスト濃度が 4×10^7 protoplasts/mL となるよう TF Sol 2 を加え懸濁させた。1 条件あたり 200 μ L を新しい 15 mL チューブにとり、形質転換用 DNA を 10 μ L (5 μ g 程度) 加え、混和後 30 分間氷中保管した。氷冷後、1350 μ L の TF Sol 3 を 3 回に分けて加え、静かに混和し、20 分間室温で静置した。その後、5 mL の TF Sol 2 を加え、混和後 2500 rpm、8 分、4°Cで遠心（ブレーキオフ）した。上清を捨てて、500 μ L の TF Sol 2 に再懸濁させたのち、懸濁液と保温しておいた Top Agar を混和し、素早く選択培地上に重層した。重層後のプレートは 10 分程度乾かし、30°Cで静置培養した。

PCR による pPTRII プラスミド保持の確認

形質転換体のゲノムを「麴菌からのトータル DNA 回収」に従いで回収後、GoTaq Green Master Mix (Promega) と確認用プライマーで確認した。プラスミド保持の確認にはトータル DNA (ゲノム DNA とプラスミド DNA) が 20 μ L PCR 反応液中に 5 ng の量で PCR を行った。

・ PCR 反応液組成	(/20 μL)
GoTaq® Green Master Mix, 2X	10 μL
10 μM Forward primer (PtrII-check-F)	0.6 μL
10 μM Reverse primer (PtrII-check-R)	0.6 μL
Template	1 μL
DW	7.8 μL
Total	20 μL

相同組換え体のコロニーPCRによる確認

形質転換体のコロニーを竹串でつつき、1.5 mL チューブに分注された Buffer A (100 mM Tris-HCl (pH9.5)、1 M KCl、10 mM EDTA) 25 μL に懸濁した。チューブを 3 分間ボルテックスミキサーで混和した後、1 分間電子レンジで加熱し、再び 3 分間ボルテックスミキサーで混和した。スピンドウ ン後の上清を PCR テンプレートとして用いた。KOD Fx Neo (Toyobo) を用いたコロニー PCR の反応液組成は 0.5 μL テンプレート溶液、0.75 μL Forward プライマー (10 μM)、0.75 μL Reverse プライマー (10 μM)、12.5 μL 2x KOD Fx Neo buffer、5 μL dNTP mix、0.5 μL KOD Fx Neo、5 μL DW を 1 反応サンプルとして調整した。サーマルサイクラーの設定を下に示した。

1. 94°C 2 min.
2. 98°C 10 sec.
3. 68°C (1min./kb で設定) (2-3 を x35 繰返)
4. 68°C (1 min./kb)
5. 16°C, ∞

第3章 黒麹菌の細胞壁多糖である α -1,3-glucan を合成する *agsE* が プロトプラスト形成に与える影響

第1節 緒言

黒麹菌 *Aspergillus luchuensis* は沖縄の泡盛や九州の焼酎など、日本の伝統的な蒸留酒の醸造に広く使用されている糸状菌である。醤油や味噌、清酒の製造で用いられる黄麹菌 *Aspergillus oryzae* と共に、黒麹菌は日本における国菌として認定されている。清酒醸造に用いられる黄麹菌と違い、黒麹菌はクエン酸産生能に優れ、醸造中の醪の pH を低下させ腐造を防止すると共に、菌体外に耐酸性酵素を多く分泌する。このような特徴を利用して、泡盛醸造だけでなく、他産業への応用利用にも興味を持たれている。現在までに *A. luchuensis* NBRC4314 株のゲノムが配列決定されており(5)、DDBJ 等のデータベースで公開されているため、*A. luchuensis* のゲノム情報を利用した分子生物学の研究を進める準備が整いつつある。

しかしながら、黄麹菌等で一般的に行われているプロトプラスト-PEG 法による形質転換が黒麹菌では適応できず、分子生物学的解析がゲノム配列の決定後においても黄麹菌と比べて非常に遅れていた。麹菌のプロトプラスト調製に一般的に用いられている細胞壁溶解酵素である Yatalase が黒麹菌では効かず、プロトプラストを得ることが非常に困難であるため、黒麹菌の形質転換は、プロトプラスト-PEG 法による手法が用いられず、代替法としてアグロバクテリウム法が用いられている。このアグロバクテリウム法により、これまでにヒト

DNA リガーゼ IV ホモログをコードする *ligD* 遺伝子の欠失株 ($\Delta ligD$ 株) が構築され (9)、多くの黒麹菌研究の場面で用いられている。プロトプラスト-PEG 法はアグロバクテリウム法と比べ、簡便であること以外にも、DNA のみならずタンパク質も導入可能であることがメリットとして挙げられる。

様々な検討の結果、Yatalase と α -1,3-glucanase を併用して使用することで、これまで困難であった黒麹菌のプロトプラスト化が可能となり、プロトプラスト-PEG 法による形質転換が可能となった。そこで本研究では α -1,3-glucan 合成遺伝子が無ければ、Yatalase 単独でプロトプラスト調製が可能になるのではないかという仮説を立て、その検証を行った。

第 2 節 材料および実験方法

供試菌株および培地

一般的な大腸菌の操作については、Sambrook らの方法に従った (15)。大腸菌 DH5 α 株 (ニッポンジーン株式会社、東京、日本) を使用してクローニング操作およびプラスミドの調整に利用した。*A. luchuensis* の野生株は、ゲノムシーケンシングプロジェクトで解読された *A. luchuensis* NBRC4314 (RIB2604 : National Research Institute of Brewing Stock Culture) (5) を使用した。*A. luchuensis* ゲノム DNA は、Mizutani らの操作方法に従って準備した(11)。NBRC4314 より派生した *A. luchuensis ligD* ノックアウト変異体 ($\Delta ligD$) (9) を、*agsE* ノックアウト変異体 ($\Delta agsE$) を構築するための宿主株として使用した。これらの菌株は、ポテトデキストロース培地 (PD 培地) (BD Difco、東京、日本) で植継いだ。Czapek-dox (CD) 培地 (2% グルコース、0.3 % NaNO₃、0.2% KCl、0.1% KH₂PO₄、0.05% MgSO₄ · 7H₂O、および 0.002% FeSO₄ · 7H₂O [pH 5.5]) および YPD (1% 酵母エキス、2 % ポリペプトン、2% グルコース) を、プロトプラストを生成するための前培養培地として使用した。プロトプラスト-PEG 法による形質転換実験の場合、MMS 培地 (2% グルコース、0.2% NH₄Cl、0.1% (NH₄)₂SO₄、0.05% KCl、0.05% NaCl、0.1% KH₂PO₄、0.05% MgSO₄ · 7H₂O、および 0.002% FeSO₄ · 7H₂O [pH5.5]) に 1.2M ソルビトールを添加したものを使用した。

agsE 破壊株の構築

agsE 破壊に使用したプラスミド (Δ *agsE::hph/pRIE*) は以下のように生成した。*agsE* 遺伝子の 5'および 3'フラグメントは、*A. luchuensis* NBRC4314 株のゲノム DNA をテンプレートとして、5*agsE*Fw, 5*agsE*Rv プライマーおよび 3*agsE*Fw, 3*agsE*Rv プライマーを使用し、PCR によってそれぞれ得られた。pBA1_hph プラスミドは、グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ (*gpdA*) プロモーターとターミネーターからなる *hph* 発現カセットを持っており、このうち、ハイグロマイシン B 耐性遺伝子 (*hph*) カセットは、pBA1_hph (O. Yamada, 未発表データ) を *KpnI* で消化することにより生成した。また、アグロバクテリウム及び大腸菌におけるバイナリーベクター pRIE (9)を *EcoRI* で消化し、ゲル精製を行った。これらの 4 つの DNA フラグメントは、In-Fusion Cloning Kit (タカラバイオ本社、滋賀、日本) を使用してライゲーションし、 Δ *agsE::hph/pRIE* を得た。

A. luchuensis Δ *ligD* を宿主株とし、AMT 法 (10) を使用して Δ *AlagsE::hph/pRIE* を用いて形質転換を行った (Fig. 3-1)。*A. luchuensis* の形質転換体をハイグロマイシン耐性 (0.1 μ g/mL) を指標に選抜し、ハイグロマイシンを含む CD 寒天プレート上で少なくとも 1 回継代培養した。これらの形質転換体を、プライマーセット 1 (*hph*Fw, *agsE*confRv) およびプライマーセット 2 (*agsE*confFw, *agaE*confRv) を使用して、コロニーPCR に供した (Table. 1)。 Δ *agsE::hph* フラグメントが標的の *agsE* に挿入された場合、2.7 kb の PCR 産物がプライマーセット 1 で生成される。これに対してプライマーセット 2 で 2.0 kb の PCR 産物

が生じる場合、フラグメントが非相同でゲノムに挿入されたことを示す。*agsE* 遺伝子の $\Delta agsE::hph$ コンストラクトによる置換はサザンブロット解析によっても確認した。ハイブリダイゼーションに使用した *agsE* プローブは、*A. luchuensis* の野生型ゲノムをテンプレートとして使用し、プライマー *agsEp-Fw* および *agsEp-Rv* (Table. 1) を使用した PCR によって得た。ゲノム DNA は *SphI* で消化し、メンブランにトランスファーした。

A. luchuensis 野生型および $\Delta agsE$ 株におけるプロトプラストの生成

野生型 *A. luchuensis* のプロトプラストは、*Aspergillus kawachii* プロトプラスト調製法を一部改変して調製した (16)。野生型 *A. luchuensis* を CD 培地を用いて、30°C で 18 時間振とうまたは静置培養した菌体を用いた。菌体のプロトプラスト化は 20 mg/mL *Yatalase* (Takara Bio Inc.) および 2.5 μ g/mL 精製 α -1,3-*glucanase* (山形大学矢野成和准教授より寄贈) (17,18)、0.6 M 硫酸アンモニウム、50 mM マレイン酸塩緩衝液、pH 5.5 で 3 時間処理した。一方、 $\Delta agsE$ と野生型のプロトプラスト形成を比較するために、これらの菌糸体を上記と同じ条件下で処理する際に、 α -1,3-*glucanase* を添加しないものを用意した。プロトプラストはミラクロス (Merck Millipore Corp., Darmstadt, Germany) を使用して未反応の菌体と分離した。プロトプラスト数のカウントは顕微鏡下でトーマ細胞計算盤を使用して計数し、各条件は 3 回以上カウントした。

プロトプラスト-PEG 法による *A. luchuensis* の形質転換

野生型 *A. luchuensis* プロトプラストは、Gomi らによって記述されたプロトプラスト-PEG 法に従って形質転換された(19)。形質転換にはピリチアミン耐性遺伝子 (*ptrA*) を保有する pPTRII ベクター (タカラバイオ株式会社) を用いた。*A. luchuensis* 形質転換体は、0.1 µg/mL ピリチアミンを含む MMS プレート上で選択し、ピリチアミンを含む MMS プレート上で少なくとも 1 回継代培養した。候補株は、プライマーセット pPTRIIconf-Fw および pPTRIIconf-Rv を使用してコロニーPCR に供した (Table. 1)。

oliC31 マーカーカセットの構築とプロトプラスト-PEG 法による *A. luchuensis* Δ *agsE* への導入

oliC31 マーカーを含む pCR_Al_oliC31 プラスミドは、Ward らの論文(20)を元に以下の通り作成された。プロモーターおよびターミネーターを含む *A. luchuensis oliC* は、*A. luchuensis* NBRC4314 株のゲノム DNA をテンプレートとして使用して、AloliCf および AloliCr プライマーを使用し、PCR によって得られた。増幅されたフラグメントを、pCR-Blunt ベクター (Thermo Fisher Scientific Inc., Yokohama, Japan) にクローニングした後、DNA 配列をシーケンスによって確認した。*oliC* 遺伝子は、QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit (Agilent Technologies Ltd., Tokyo, Japan) を使用して、AloliCmut1 および AloliCmut2 プライマーを使用して変異導入し、pCR_Al_oliC31 を作成した。*A. luchuensis* Δ *agsE* を上記のプロトプラスト-PEG 法による形質転換法に従って

NotI で消化した pCR_Al_oliC31 を使用して形質転換した。形質転換体をオリゴマイシン耐性 (1.5 µg/mL) を指標に選抜し、オリゴマイシン (1.5 µg/mL) を含む MMS 寒天上で少なくとも 1 回継代培養した。これらの形質転換体候補株を、プライマーセット (oliC31conf-Fw および oliC31conf-Rv) を用いたコロニー PCR に供した。PCR 産物を KpnI で消化して、oliC 遺伝子座での oliC31 フラグメントの組み込みを確認した。PCR 産物は KpnI サイトの部位の有無で変異導入 oliC31 (KpnI サイトあり) と野生型 oliC (KpnI サイト無し) を区別することができる。

A. luchuensis ΔagsE への agsE の相補実験

agsE 発現プラスミド pBAlagsE_blev2 構築のために、*Streptoalloteichus hindustanu* 由来の ble 遺伝子 (フレオマイシン耐性遺伝子) を含むプラスミドを以下のように準備した。A. luchuensis 由来の gpdA のプロモーターと gpdA のターミネーターは、A. luchuensis NBRC4314 ゲノム DNA をテンプレートとして使用して Alble1, Alble2 プライマーおよび Alble5, Alble6 プライマーを使用し、PCR によって増幅した。ble 遺伝子は、pPICZαA ベクター (Thermo Fisher Scientific) をテンプレートとして使用して、Alble3, Alble4 プライマーで増幅した。次に、クローニングベクター pBluescriptSK を KpnI で消化した。これらの 4 つの DNA 断片を精製した後、In-Fusion Cloning Kit (タカラバイオ) を使用してライゲーションし、pBA1_ble を得た。次に、gpdA プロモーターと ble 遺伝子からなる 1.4 kb のフラグメントを、pBA1_ble を KpnI と EcoRI で消化すること

により得た。このフラグメントを、*A. oryzae* の *gpdA* ターミネーターを含む pSK-T ベクター (Ogawa,未発表データ) の KpnI および EcoRI サイトにライゲーションし、pBA1_bleV2 を生成した。*agsE* プロモーターを含む 3 kb の相同領域を含む *A. luchuensis agsE* カセットを、*A. luchuensis* NBRC4314 株ゲノム DNA をテンプレートとして使用して、RagsE-Fw, RagsE-Rv プライマーで増幅した。次に、pBA1_bleV2 プラスミドを KpnI で消化し、これら 2 つの DNA フラグメントを In-Fusion Cloning Kit を使用してライゲーションし、pBA*agsE*_bleV2 を作成した。

agsE 相補株を取得する為、*A. luchuensis ΔagsE* を宿主株に、Bst1107I で消化された pBA*agsE*_bleV2 を用いて形質転換を行った。*A. luchuensis* の形質転換体をフレオマイシン耐性 (100 μg/mL) (Nacalai Tesque Inc., Kyoto, Japan) を指標にスクリーニングし、フレオマイシン (100 μg/mL) を含む MMS 寒天培地で少なくとも 1 回継代培養した。これらの形質転換体候補株を、CagsEconf-Fw1, CagsEconf-Rv1 プライマーおよび CagsEconf-Fw2, CagsEconf-Rv2 プライマーを用いたコロニーPCRに供し、確認を行った。消化された pBA*agsE*_bleV2 プラスミドが標的遺伝子座に挿入された場合、6.1 kb および 1.7 kb のフラグメントがこれらのプライマーセットでそれぞれ増幅される。

Table. 1 Primers used in this chapter.

Primer name	Sequence (5' to 3')
5agsEFw	CGTTTTTAATGAATTCGAGAGTGGCCCATGTTTTTTTCAATGGG
5agsERv	GAGCTCAATGGCCCGCGGGATGACCACCGGTCAACAAACCAGG
3agsEFw	TGGACCCCGAAGGCGGCTTGAGCACCCTGGGCATGAACATTC
3agsERv	AGTTTAAACTGAATTCCATCTTTCGATCATTCCACATTGCAGGA G
hphFw	GTTTCGGTTTCAGGCAGGTCTTGCAAC
agsEconfRv	GCTGGTCGAGCTGAATGTCTTGGAGGG
agsEconfFw	CGTCATCCTTCAAACCTTCTTCCTTAGCGC
agsEp-Fw	GTCCGCCCTTATCAGACCCAAATTTCC
agsEp-Rv	CCGGTAGGCATTTTACGGTGGAATC
pPTRIIconf-Fw	GTAAATAGCATGGGTTGAG
pPTRIIconf-Rv	CCAATGCTTAATCAGTGAGGC
AloliCf	TATGTGTGTATGCGTACACAGGATGTG
AloliCr	TCGAGCTGTTTCAGTCTGACCGACA
AloliCmut1	TGCCGGTATCGGTAcCGGTCTCGTCTTCG
AloliCmut2	CGAAGACGAGACCGgTACCGATACCGGCA
oliC31conf-Fw	TGTGGTGGAAATGTCCACTGCT
oliC31conf-Rv	CTAAGCTGGACCGAGCACTGT
Alble1	TCGAGGGGGGGCCCGAAGGCGAAGGTACCGCCTTCG
Alble2	GGTCAACTTGGCCATTGTGTAGATGTGTCTGTTCG
Alble3	ATGGCCAAGTTGACCAGTGCCG
Alble4	TCAGTCCTGCTCCTCGGC
Alble5	GAGGAGCAGGACTGAGAATCAGGACGGCAAAC

Alble6	GTAATACGACTCACTATAGGGCGAATTGGGTACCGGG
CagsE Fw	TATAGGGCGAATTGGCAATACTGACAGTACCTTACCGCCAAGT GG
CagsE Rv	TGGACCCCGAAGGCGCATTCAACGAGTCGAAACACTCTCACAC G
CagsEconf-Fw1	CAATTTCCATTCGCCATTCAGGCTGCGC
CagsEconf-Rv1	GGCTCACTATTCTGCACCCAAGACAAGTTAC
CagsEconf-Fw2	TGCCCTGCGTCGGGGGCGTTGA
CagsEconf-Rv2	CTTCGTGTTTCAGGGATACTGTCGCGTTG

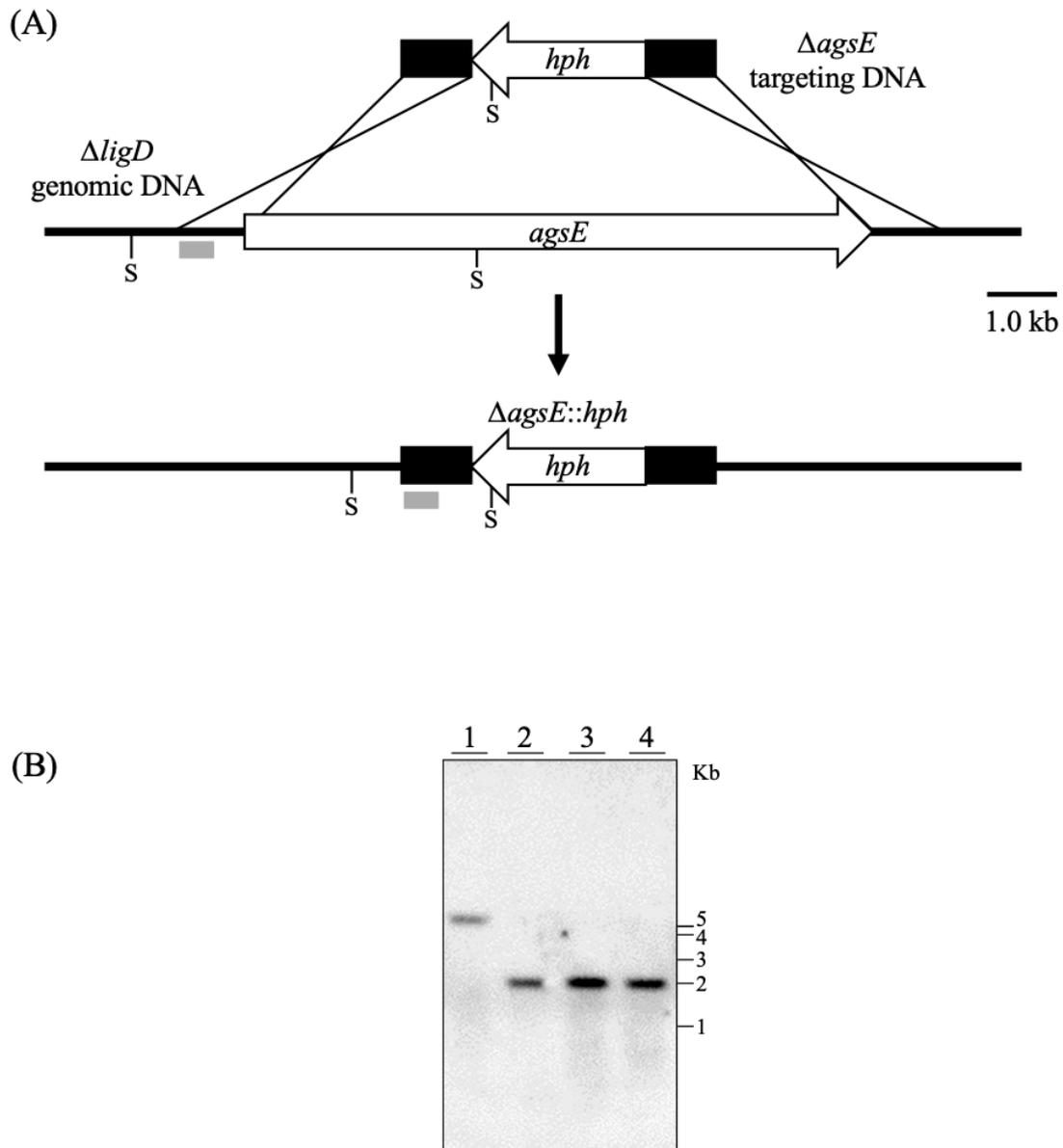


Fig. 3-1 Generation of the $\Delta agsE$ strain. (A) Strategy for homologous recombination in *A. luchuensis* for *agsE* gene disruption using the *hph* gene marker cassette as a selectable marker. The gray bar indicates the hybridization position of the probe to confirm the gene replacement by Southern blot analysis. *Sph*I restriction site is indicated by the letter S. (B) Southern blotting of the genomic DNA from transformants. Each lane contained 20 μ g of restriction enzyme-digested genomic DNA from the $\Delta ligD::ptrA$ (parental strain) (lane 1); $\Delta agsE::hph$ no. 1, 2, and 3 (lanes 2, 3, and 4) cut with *Sph*I.

第3節 結果と考察

A. luchuensis 野生株における α -1,3-glucanase によるプロトプラスト形成とその形質転換

A. luchuensis のプロトプラストを調製するために、まず Mizutani らの報告を参考に Yatalase、cellulase R-10 (Yakult, Tokyo, Japan) および lysing enzyme (Merck Millipore Corp.) を使用して、*A. oryzae* でのプロトプラストを調製する方法を試みた (21)。両方の菌株を同量の菌体湿重量分用意しプロトプラスト化反応を行うと、この方法では、1 バッチあたり 10^8 を超える *A. oryzae* のプロトプラストが生成されたが、*A. luchuensis* のプロトプラストは得られなかった。次に Tashiro らによる Yatalase と cellulase R-10 を用いた *A. kawachii* の方法を参考に、*A. luchuensis* と *A. kawachii* のプロトプラスト形成を比較した (16)。この方法では、*A. kawachii* では1 バッチあたり 2.4×10^7 のプロトプラスト細胞が生成され、*A. luchuensis* では1 バッチあたり 5.3×10^4 のプロトプラストが生成された。これらの結果は、*A. kawachii* では *A. luchuensis* の約 450 倍のプロトプラストが得られた事を示した。この方法によって得られた *A. luchuensis* のプロトプラスト量は1 バッチあたり 5.3×10^4 であり、これは1 回の形質転換に必要なプロトプラスト量としては非常に少なく、プロトプラスト-PEG 法による形質転換は現実的ではないことが明らかとなった。

A. luchuensis NBRC4314 株のプロトプラストは、上記の Mizutani らによる方法、Tashiro らによる方法を使用して調製するのが非常に困難であったため、さまざまな前培養の方法と細胞壁分解酵素を Yatalase と共に併用することを検討した。その結果、静置培養した菌体を Yatalase と α -1,3-glucanase で反応処理すると、プロトプラストが得られることが確認できた (Fig. 3-2)。

これと反対に、Yatalase 単独によるプロトプラスト化反応と比較して、Yatalase に加えて Zymolyase または cellulase を使用しても、プロトプラスト形成に影響は無かった (Table. 2)。さらに、前培養用の培地として YPD の代わりに最小培地を使用すると、*A. luchuensis* のプロトプラスト形成効率が最も良くなった (未発表データ)。これらの結果は、*A. luchuensis* NBRC4314 からのプロトプラストの効率的な調製には、3 つの条件 (i) 菌糸を得るための前培養培地としての最小培地を使用する、(ii) 静置培養する (振とうの場合、プロトプラスト収量が減少する)、(iii) 細胞壁分解酵素として Yatalase および α -1,3-glucanase を用いる) が揃う必要があることが示唆された。*A. luchuensis* の CD 液体培地の振とう培養および静置培養における菌糸を観察した結果、静置培養における菌糸は、振とう培養の菌糸よりも凝集が少ないことが示された (Fig. 3-3)。この現象は、*A. luchuensis* 野生株を親株とする Δ ligD 株でも観察された (Fig. 3-4B)。

これらの結果により、静置培養による凝集の減少により、菌糸に対して細胞壁溶解酵素が効率よく作用したことが示唆された。一方、*A. nidulans* において、CD 液体振とう培養菌体のプロトプラスト化の際に、溶解酵素として Lysing

Enzymes のみを使用した場合と比較して、 α -1,3-glucanase と Lysing Enzymes の両方を添加することで、より多くのプロトプラストが得られたとする報告がある (22)。*A. luchuensis* の場合、プロトプラストを得るためには、静置培養が振とう培養よりも効果的であることが分かった。これらの結果により振とう培養した *A. luchuensis* の菌糸は、*A. nidulans* 菌糸よりも強く凝集することに起因すると考えられた。よって、振とう培養により得られた *A. luchuensis* の菌体を用いたプロトプラスト化は、 α -1,3-glucanase を使用した場合でも、静置培養して得られた菌体を用いた場合のプロトプラスト化と比較して効率が低いと考えられた。

上記の方法で調製した *A. luchuensis* NBRC4314 のプロトプラスト細胞 (2×10^6 cells) を用いてプロトプラスト-PEG 法による転換を行った。形質転換のためのプラスミドは、ピリチアミン耐性遺伝子 (*ptrA*)、および *A. nidulans* の自律複製起点である AMA1 を含む pPTRII ベクターを使用して行った。形質転換を試みた結果、ピリチアミンを含む MMS 寒天プレート上でいくつかの形質転換体が観察された (Fig. 3-5A)。これらの形質転換体が pPTRII プラスミドを保持しているのかを確認するために、候補株のゲノムを精製し、pPTRIIconf-Fw, pPTRIIconf-Rv プライマーを使用して PCR を行った。約 1.0 kb のフラグメント増幅が観察され、目的のプラスミドを保持していることが確認された (Fig. 3-5B)。 *A. luchuensis* NBRC4314 の形質転換効率は 1.2 CFU/ μ g pPTRII DNA (n =

3) であり、*A. luchuensis* NBRC4314 株からプロトプラストを生成し、プロトプラスト-PEG 法による形質転換ができることを示した。

Enzymes	Protoplast concentration [protoplast cells/mL · g]
2% Yatalase	$1.4 \pm 0.50 \times 10^5$
2% Yatalase+ α -1,3-glucanase	$2.6 \pm 0.74 \times 10^6$
2% Yatalase+1% Cellulase R-10	$1.2 \pm 0.55 \times 10^5$
2% Yatalase+1% Zymolyase-20T	$7.5 \pm 0.47 \times 10^5$

Table 2. Protoplast formations with different kinds of enzyme combination. Protoplast cells were prepared with various enzymes at 30°C for 90 minutes reaction. Each reaction used mycelia harvested with static CD medium culture for 18 hours at 30°C. Values are mean \pm SE.

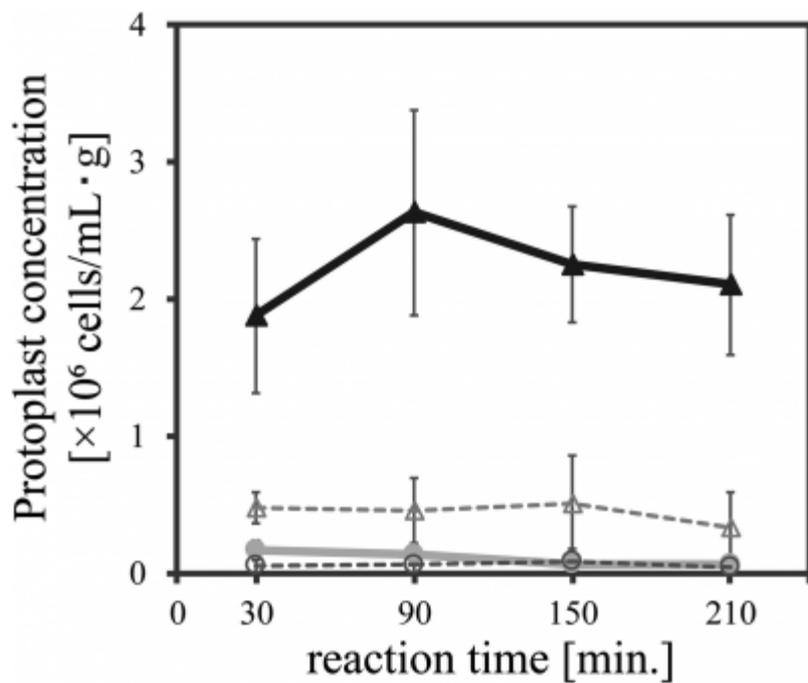


Fig. 3-2. Protoplast concentration under normal conditions (2% Yatalase, circles) or with α -1,3-glucanase (2% Yatalase + α -1,3-glucanase, triangles) in *A. luchuensis* NBRC4314. The solid line indicates statically cultured cells, and the broken line indicates shaking-cultured cells. Preculture conditions: CD liquid media at 30°C for 18 h. Error bars represent the standard error of the mean (n = 3).

Shaking culture



Static culture



Fig. 3-3. Phenotypes of *A. luchuensis* RIB2604 (wild-type) in CD liquid medium with shaking (left panel) and static (right panel) cultures. (bar = 0.5 mm).

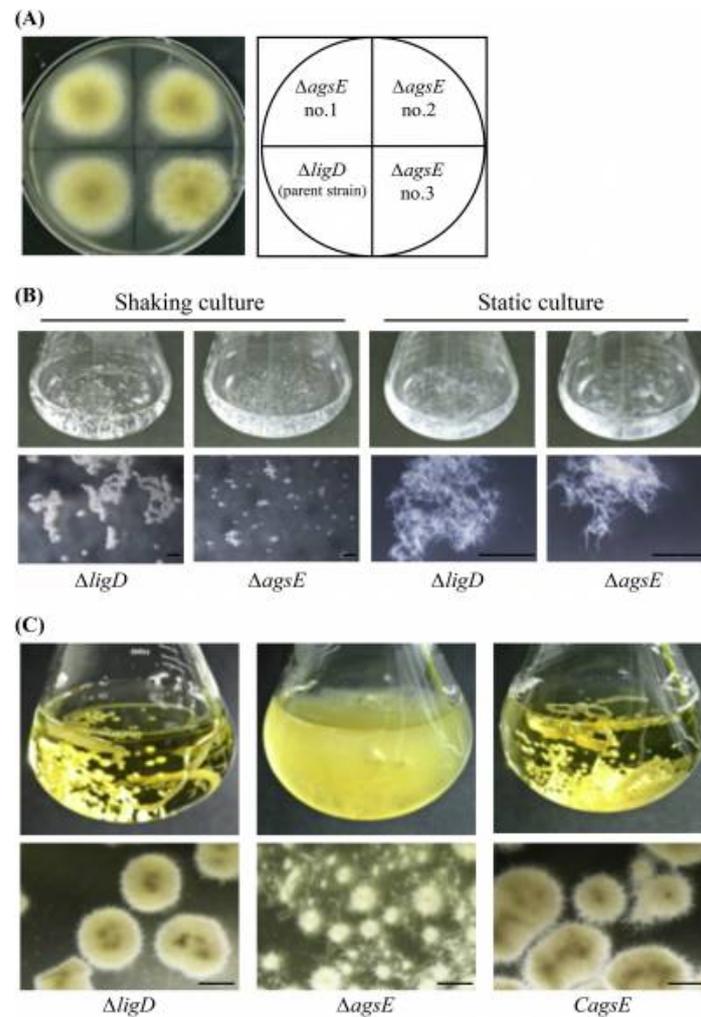


Fig. 3-4. Phenotypes of the *agsE* disruptants. (A) Left panel, *A. luchuensis* $\Delta ligD$ (a parent strain of $\Delta agsE$) and $\Delta agsE$ no. 1, 2, and 3 cells (1×10^4) were cultured on PD medium at 30°C for 5 days. The inoculated position of each cell type is indicated in the right panel. (B) Growth characteristics of the $\Delta ligD$ and $\Delta agsE$ strains. Conidia (final concentration, $2.5 \times 10^5/\text{mL}$) of each strain were inoculated into liquid CD medium and incubated at 160 rpm at 30°C for 24 h with shaking and static cultures. Upper panels, photographs of cultures in Erlenmeyer flasks. Bottom panels, representative hyphal pellets or hyphae of each strain under a stereomicroscope (bottom; bar: 1 mm). (C) Growth characteristics of the $\Delta ligD$, $\Delta agsE$, and *CagsE* strains. Conidia (final concentration, $2.5 \times 10^5/\text{mL}$) of each strain were inoculated into liquid YPD medium and incubated at 160 rpm at 30°C for 24 h. Upper panels, photographs of cultures in Erlenmeyer flasks. Bottom panels, representative hyphal pellets of each strain under a stereomicroscope (bottom; bar: 1 mm).

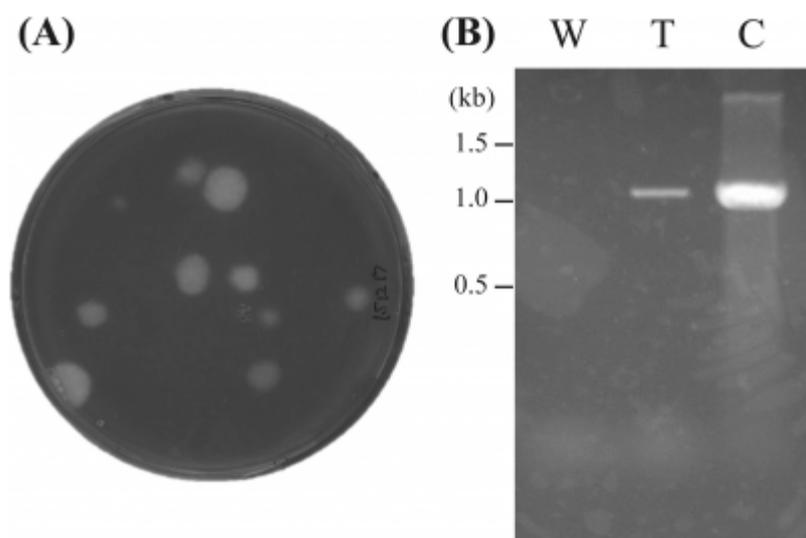


Fig. 3-5. Confirmation of transformation with pPTRII in *A. luchuensis* wild-type using the protoplast-PEG method. (A) Growth of transformants with pPTRII on MMS agar plates containing pyrithiamine at 30°C for 7 days. (B) Agarose gel electrophoresis of PCR-amplified fragments from pPTRII plasmid region in transformant. *A. luchuensis* wild-type is shown in lane W. Candidate transformed with pPTRII is shown in lane T. A positive control using pPTRII as a template is shown in lane C.

agsE 破壊株におけるプロトプラスト形成

本研究室における過去の研究に黄麹菌と黒麹菌間で細胞壁を構成するキチンや β -1,3-gulucan などの多糖の組成に顕著な差が見られ無いとする結果があり、これまで黒麹菌の Yatalase による細胞壁溶解が困難である理由は不明であった。*A. luchuensis* 野生株でプロトプラストを生成する為には α -1,3-glucanase が必要であったため、細胞壁多糖である α -1,3-glucan の影響が示唆された。 α -1,3-glucan は *A. fumigatus* の細胞壁表層に局在していることが知られており(23)、 α -1,3-glucanase を Yatalase と併用することで黒麹菌のプロトプラスト形成が促進されたことから、黒麹菌の細胞壁表層には α -1,3-glucan が *A. oryzae* などの Yatalase 単独でプロトプラストが得やすい株と比較して多く存在する推測された。また α -1,3-glucan が表層に存在することから、Yatalase が作用する細胞壁多糖であるキチン、 β -1,3-glucan などの細胞壁多糖が溶解酵素に接する割合の低下が示唆された。

α -1,3-glucan が細胞壁溶解酵素の作用を阻害していることを確かめるため、黒麹菌の α -1,3-glucan 合成酵素遺伝子に着目した。*A. luchuensis* のゲノム DNA には *A. niger* と同様に α -1,3-glucan 合成酵素をコードすると推定される遺伝子が 5 つ存在する。そこで、*A. niger* の *agsA~E* と対応する黒麹菌のそれぞれの遺伝子を *agsA~E* と命名した。黒麹菌 *agsE* は *A. nidulans* における α -1,3-glucan 合成の主要遺伝子である *agsB* と最も相同性が高く、74%の identity を有していた(22)。*A. luchuensis* 野生株でプロトプラストを生成する為には α -1,3-glucanase が必要であったため、Yatalase 単独使用による黒麹菌のプロトプラスト生成の阻害には

α -1,3-glucan 合成遺伝子 *agsE* による影響が考えられた。そこで、ATM 法を利用した、 Δ *agsE*::*hph*/pRIE プラスミドによる、 Δ *agsE*::*hph* 用フラグメントとの相同組換えにより *agsE* 破壊株を構築した (Fig. 3-1A)。破壊用フラグメントにより *agsE* 遺伝子座で相同組み換えが行われたことをコロニーPCR とサザンブロットによって確認した (Fig. 3-1B)。 Δ *agsE* 株のプレートおよび液体培養における生育を調べたところ、PD および CD プレートでの Δ *agsE* のコロニー増殖速度および分生子形成は親株と類似していることがわかった (Fig. 3-4A)。対照的に、CD 液体振とう培養した Δ *agsE* の菌糸は培地中に分散したが、親株の菌糸は凝集した (Fig. 3-4B)。CD 液体培地での静置培養では、 Δ *agsE* の菌糸の表現型は親株の表現型と類似していた (Fig. 3-4B)。さらに、YPD 液体培地で振とう培養した Δ *agsE* 株の菌糸は、CD 液体振とう培養中の菌糸よりも分散していた (Fig. 3-4C)。 *A. nidulans* の *agsB* 破壊株の菌糸は液体培養条件下で培地中に完全に分散したが (22)、 *A. luchuensis* Δ *agsE* の菌体は完全には分散せず、 *A. oryzae* Δ *agsB* および Δ *triple* (24,25) のように小さなペレットが形成された (Δ *triple* は *A. oryzae* の全ての *ags* 遺伝子の破壊株)。 *A. oryzae* では、 Δ *triple* が完全分散が観察されないため、 α -1,3-glucan に加えて他の細胞壁成分が凝集に関与していると予測されている (25)。また、黒麹菌の Δ *agsE* と親株の間で菌糸の分岐や菌糸先端の形態に違いは見られなかった (データ未掲載)。

次に *A. luchuensis* *agsE* 遺伝子のプロトプラスト形成への関与を調べるため、 Δ *agsE* のプロトプラストを調製した。CD 液体培地および YPD 液体培地での Δ *agsE* および Δ *ligD* (Δ *agsE* の親株) を植菌し、それぞれ振とうもしくは静置培

養して得られた菌体を、Yatalase で 180 分間処理した。 $\Delta agsE$ は $\Delta ligD$ と比較して、上記いずれの条件下においても多数のプロトプラストが得られた (Fig. 3-5A, B)。さらに、 $\Delta ligD$ は YPD または CD 培地を用いた静置培養と振とう培養の間でプロトプラスト濃度の有意な差は無かった。一方、 $\Delta agsE$ では、YPD で培養して得られた菌体のプロトプラストの数が CD で培養した際よりも多かった (Fig. 3-5A, B)。プロトプラスト形成の違いは、CD 培養と比較して、YPD 培養時の $\Delta agsE$ の成長速度が早いためであると考えられた。また、 $\Delta ligD$ (野生株タイプ) を CD 液体培地で静置培養して得られた菌体を Yatalase と α -1,3-glucanase を使用して調製したプロトプラストよりも、 $\Delta agsE$ 株の YPD 振とう培養菌体で調製した方が約 15 倍のプロトプラストが得られた。 $agsE$ による α -1,3-glucan 合成以外によるプロトプラスト形成阻害の影響を調べるため、Yatalase と α -1,3-glucanase の両方を使用して、 $\Delta agsE$ からプロトプラストを調製したが、 $\Delta agsE$ に Yatalase 単独で使用して調製した場合以上のプロトプラストは得られなかった (データ未掲載)。これらの結果は、AgsE が液体培養条件で α -1,3-glucan を合成することにより、*A. luchuensis* のプロトプラスト形成を阻害したことを示唆している。

A. niger の α -1,3-glucan 合成遺伝子のひとつである $agsA$ 遺伝子は、Calcofluor white、SDS、カスポファンギンなどの細胞壁ストレス誘導化合物の存在下で誘導されることが報告されている(26)。このことから $agsE$ を含む黒麹菌の ags ホモログにも、*A. luchuensis* が曝されるさまざまな環境条件に応答する役割を持っていると予測される。

プロトプラスト-PEG 法による $\Delta agsE$ 株の形質転換

A. luchuensis $\Delta agsE$ から得られるプロトプラストに形質転換能力があるかどうかを調べるために、プロトプラスト-PEG 法を使用して形質転換した。形質転換プラスミドは、オリゴマイシン耐性遺伝子である *oliC31* を含む pCR_A1_oliC31 を用いた。pCR_A1_oliC31 の導入は NotI で消化し、*A. luchuensis* $\Delta agsE$ の *oliC* 部位に挿入した (Fig. 3-6A)。オリゴマイシンを含む MMS 寒天プレートで 100 を超える形質転換体を取得し、この中から 7 つの形質転換体候補をランダムに選択し、oliC31conf-Fw, oliC31conf-Rv プライマーを使用したコロニーPCR によって確認を行った。野生型 *oliC* 遺伝子と *oliC31* マーカー遺伝子を区別するために、増幅されたバンドを KpnI で消化した (Fig. 3-6B)。これは、*A. luchuensis* の野生型 *oliC* から QuikChange を使用して *oliC31* マーカー遺伝子を作成したときに KpnI サイトが追加されたものに由来する。KpnI 消化により、7 つの形質転換体すべてで相同組換えが成功したことが確認された。したがって、これらの結果は、*A. luchuensis* $\Delta agsE$ のプロトプラストがプロトプラスト-PEG 法による形質転換に適し、形質転換可能であることを示している。さらに、日常的に形質転換に用いる場合、 $\Delta agsE$ では精製された α -1,3-glucanase を調製して使用する必要がなく、野生株より多くのプロトプラストが簡便に得られ、はるかに効率的になった。

A. luchuensis Δ *agsE*における *agsE* の相補実験

A. luchuensis agsE が、プロトプラスト形成に関与することを確認するため、*agsE* の相補株 (*CagsE*) を構築し、機能相補実験を行った (Fig. 3-7A)。*ble* マーカーカセットを含む pBA*lagsE_blev2* プラスミドを Bst107II で消化し、プロトプラスト-PEG 法を使用して Δ *agsE* 株に挿入した。得られた形質転換体は、*CagsE*conf-Fw1, *CagsE*conf-Rv1 プライマーおよび *CagsE*conf-Fw2, *CagsE*conf-Rv2 プライマーを用いたコロニーPCR によって確認した (Fig. 3-7B)。*CagsE* の菌糸は、YPD 液体培地で振とう培養した時、 Δ *ligD* 株 (Δ *agsE* の親株) と同様に凝集した (Fig. 3-4C)。加えて、*CagsE* 株のプロトプラスト調製を試みた。YPD 液体培養にて得られた *CagsE* 株の菌糸を Yatalase のみで処理したが、プロトプラストは形成されなかった、一方、 Δ *agsE* は同じ条件下でもプロトプラストがよく形成された (Fig. 3-5B)。したがって、*agsE* が *A. luchuensis* のプロトプラスト形成を阻害したことが明らかとなった。また、 Δ *agsE* は、pBA*lagsE_blev2* プラスミドを使用して形質転換でき、さまざまな遺伝子実験の親株として Δ *agsE* 株を使用できることが示された。

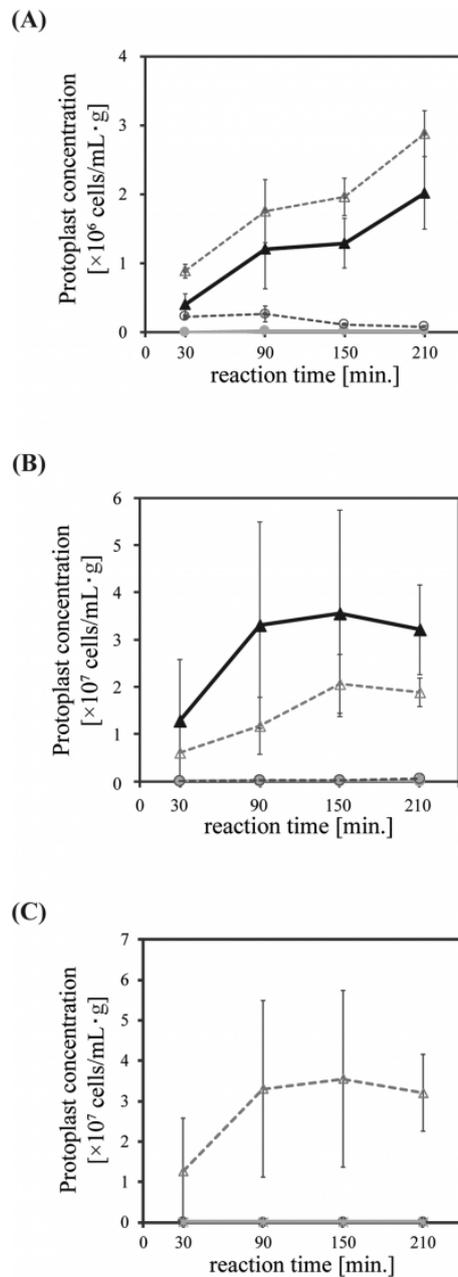


Fig. 3-5. Protoplast formation in $\Delta agsE$ and *CagsE* under normal conditions. (A) Protoplast concentration of *agsE* disruptant (triangles) and its parent strain ($\Delta ligD$; circles). Solid line, results of the shaking-cultured cells; broken line, results of the statically cultured cells. Each strain was cultured in CD medium at 30°C for 18 h. (B) The legend symbols are the same as panel A. Each strain was cultured in YPD medium at 30°C for 18 h. (C) Protoplast concentration for $\Delta agsE$ (open triangle and broken line), its parent strain ($\Delta ligD$; circle and solid line), and *CagsE* (star and solid line) under condition where $\Delta agsE$ protoplasts could be obtained (YPD medium, shaking-cultured cells, 18 h, 30°C) are indicated.

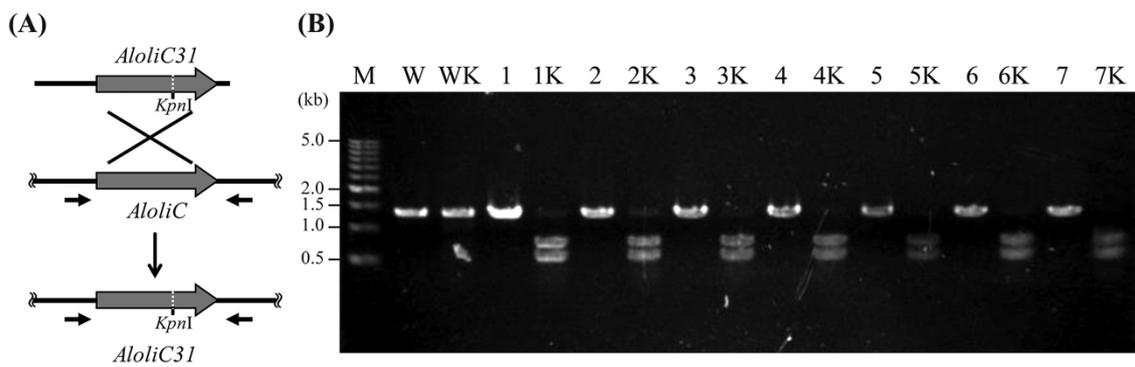


Fig. 3-6. Confirmation of transformant derived from *A. luchuensis* Δ *agsE* using the protoplast-PEG method. (A) Strategy for homologous recombination of *A. luchuensis* Δ *agsE* for replacing the native *oliC* with the *oliC31* marker gene. (B) Agarose gel electrophoresis of amplified DNA products obtained from PCR (numbered) and amplified DNA products digested with *KpnI* from Δ *agsE* transformants (with capital K).

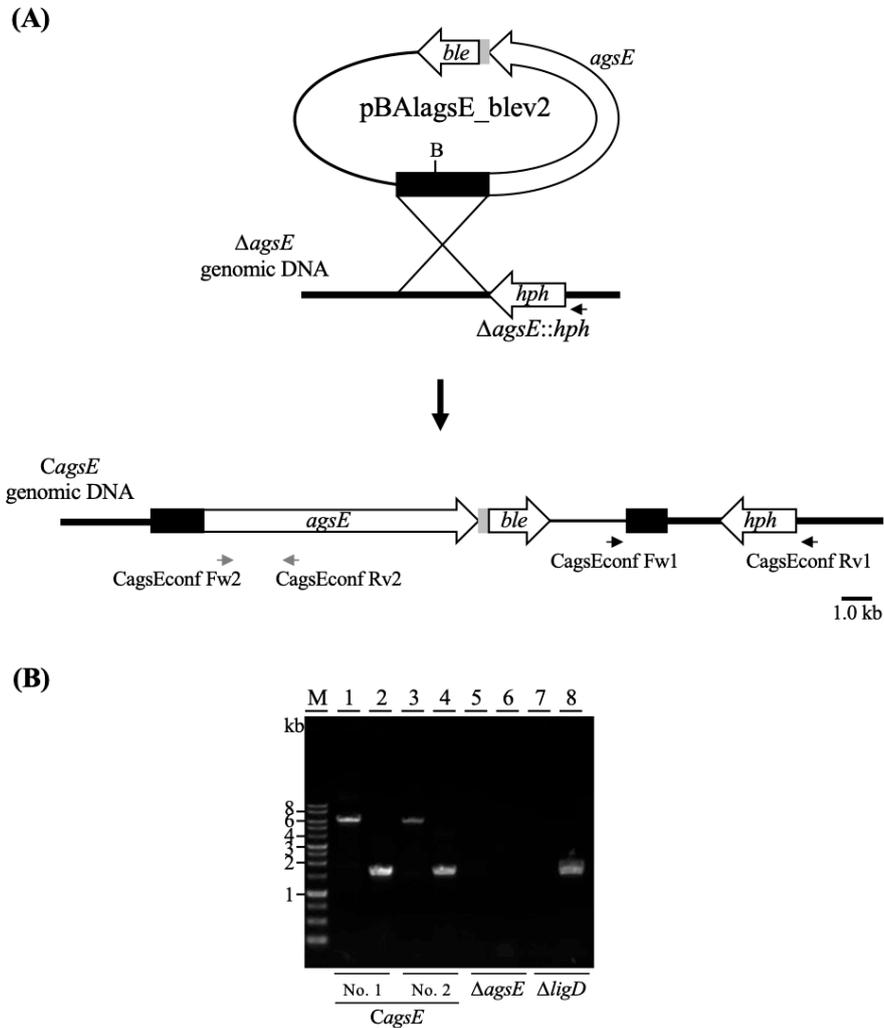


Fig. 3-7. Generation of the *agsE* complementation strain (*CagsE*). (A) Strategy for homologous recombination in *A. luchuensis* Δ *agsE* for *agsE* gene complementation using *ble* gene marker cassette as a selectable marker. Black and gray bars indicate 5' and 3' regions of *agsE* ORF, respectively. Arrow indicates the position of the primer annealing for confirmation of the *agsE*-complemented strain. *Bst*1107I restriction site is indicated by the letter B. (B) Agarose gel electrophoresis of amplified DNA products obtained from colony PCR of *agsE* complementation strains. Odd-numbered lanes contain genomic DNA from the transformants (*CagsE*), Δ *agsE* (parent strain of *CagsE*), and Δ *ligD* (parent strain of Δ *agsE*) subjected to PCR with primers CagsEconf-Fw1 + CagsEconf-Rv1 (black arrows). Even-numbered lanes contain genomic DNA from the transformants (*CagsE*), Δ *agsE*, and Δ *ligD* subjected to PCR with primers CagsEconf-Fw2 + CagsEconf-Rv2 (gray arrows).

第4節 小括

黒麹菌のプロトプラストは市販の糸状菌用細胞壁溶解酵素である Yatalase では一般的な手法で生成することができない。Yatalase と α -1,3-glucanase を併用すると黒麹菌においてもプロトプラストを得ることが可能になることが分かった。また、得られたプロトプラストを利用して実際にプラスミドを導入し、形質転換を行うことができた。次に、 α -1,3-glucanase の作用基質である黒麹菌細胞壁多糖の α -1,3- glucan の合成遺伝子の一つである *agsE* を破壊した株を造成すると、Yatalase のみを溶解酵素として使用しても黒麹菌のプロトプラストを得ることができた。また、*agsE* 破壊株の形質転換が可能であるか及び、*agsE* が原因遺伝子であることの両方を確かめるため、*agsE* 破壊株へ *ble* マーカーを用いて *agsE* を相補する実験を行った。その結果、*agsE* 破壊株は *ble* マーカーを用いて形質転換可能であった。また、*agsE* 相補株は親株と比較してプロトプラストが Yatalase 単独で容易に生成することができなくなった。

第4章 薬剤耐性マーカー遺伝子 *itrA* の構築

第1節 緒言

糸状菌である黄麹菌 *Aspergillus oryzae* は味噌や醤油といった醸造食品から酵素剤といった産業利用まで幅広く利用されている重要な産業微生物である。糸状菌は種々の抗生物質に対して強い耐性を持つためセレクションに利用可能な薬剤と耐性マーカー遺伝子に制限があり、遺伝子組換え等の実験には一般的に栄養要求性のある実験室株を用いることが多い。これは黄麹菌だけに当てはまる問題ではなく、黒麹菌や様々な糸状菌に共通する問題である。全ての糸状菌の栄養要求性株が取得されているわけではないため、産業上有用な菌株のように、野生株でも用いることのできる薬剤耐性マーカー遺伝子の開発は重要である。既に黄麹菌と黒麹菌で利用可能なピリチアミン耐性遺伝子、黒麹菌で利用可能なハイグロマイシン耐性遺伝子等があるが、より多くの種類があることが望ましい。そこで本研究では、黄麹菌、黒麹菌で利用できる形質転換マーカーを開発することを目的として、エルゴステロール生合成を阻害するアゾール系薬剤のひとつであるイトラコナゾール耐性遺伝子を開発した。イトラコナゾールは真菌の細胞膜を構成する重要な脂質であるエルゴステロール合成経路において sterol 14-demethylase として機能する Cyp51 に結合し、反応を阻害することで細胞膜合成障害を引き起こし、生育を阻害する (Fig. 4-1)。

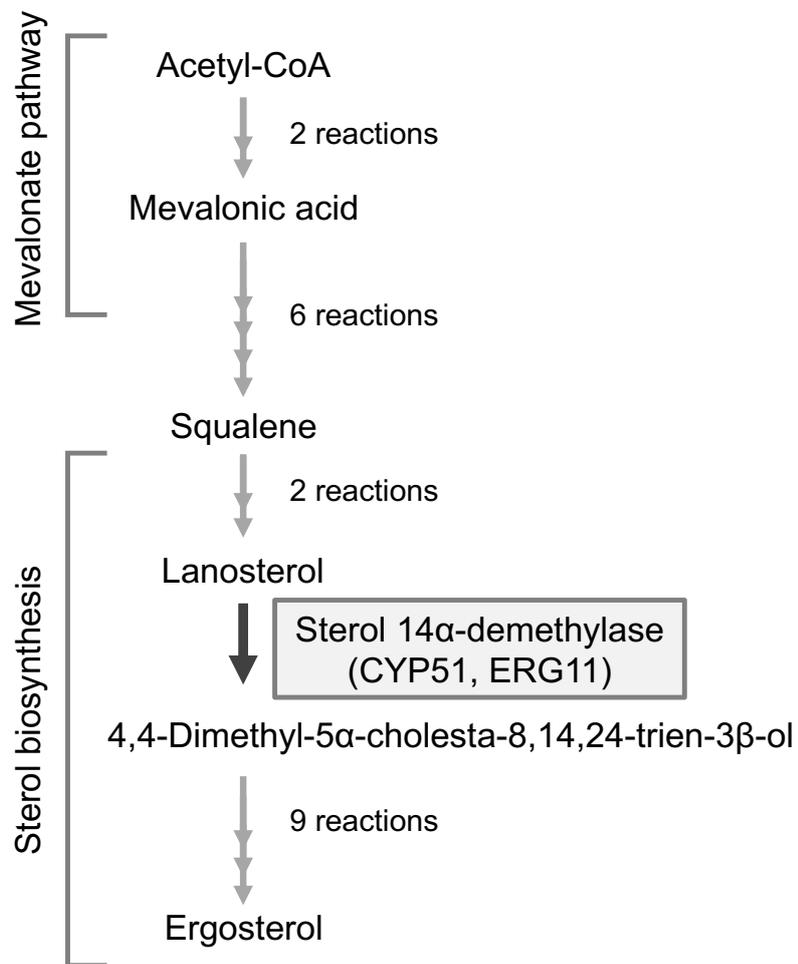


Fig. 4-1. Schematic of the ergosterol synthesis system in fungi

第 2 節 材料および実験方法

供試菌株および培地

一般的な大腸菌の操作については、Sambrook らの操作方法に従った(15)。大腸菌株 DH5 α 株（ニッポンジーン株式会社、東京、日本）を使用してプラスミドを増殖させた。ゲノムシーケンシングプロジェクトに使用された *A. luchuensis* NBRC4314（RIB2604 : National Research Institute of Brewing Stock Culture）(5)、および *A. oryzae* niaD300 (*niaD*⁻) (27) を野生株および宿主として使用した。*A. oryzae* および *A. luchuensis* の PCR テンプレート用の ゲノム DNA は Mizutani らの手法 (11) に従って準備した。

これらの菌株の植継ぎには、ポテトデキストロース（PD）プレート（BD Difco、東京、日本）を使用した。プロトプラストを生成するための前培養培地として、DPY（2% デキストリン、1% ポリペプトン、0.5% 酵母エキス、0.5% KH₂PO₄ および 0.05% MgSO₄ · 7H₂O）を使用した。

プロトプラスト-PEG 法を使用した形質転換実験では、1.2 M ソルビトールを含む CD 培地（2% グルコース、0.3% NaNO₃、0.2% KCl、0.1% KH₂PO₄、0.05% MgSO₄ · 7H₂O、0.002% FeSO₄ · 7H₂O [pH 5.5]） および M 培地（2% グルコース、0.2% NH₄Cl、0.1% (NH₄)₂SO₄、0.1% KH₂PO₄、0.05% KCl、0.05% NaCl、0.05% MgSO₄ · 7H₂O、0.002% FeSO₄ · 7H₂O [pH 5.5]）を使用した。

イトラコナゾール耐性マーカーの構築

A. oryzae のイトラコナゾール耐性変異株を構築するために使用するプラスミド (pDAlcyp-T および pNitrA) は以下のように作成した。また、各種プライマー配列は、Table 3 に示した。野生型プロモーターおよびターミネーターを含む *A. luchuensis cyp51A* (*Alcyp51A*) は、*A. luchuensis* NBRC4314 ゲノム DNA をテンプレートとして P1 および P2 プライマーを使用し、PCR によって増幅されゲル精製された。*niaD* マーカー、*enoA142* プロモーター、および *agdA* ターミネーターを含む発現ベクター pNEN142 (28) を *AvaI* で消化し、ゲル精製により、*enoA142* プロモーターおよび *agdA* ターミネーターを除く 6.9 kb の DNA 断片を得た。これらの 2 つの DNA 断片は、In-Fusion Cloning Kit (Takara Bio Inc., 滋賀, 日本) を使用してライゲーションし、pDAlcyp-W を得た。

Alcyp51A の G52R 変異は、QuickChange II Site-Directed Mutagenesis Kit (Agilent Technologies, Inc., 米国カリフォルニア州サンタクララ) と P3 および P4 プライマーを使用して行い、pDAlcyp-W に変異を導入したプラスミド、pDAlcyp-T を得た。次に、変異導入した *Alcyp51A* 遺伝子の配列をサンガー法によってシーケンスし変異導入を確認した (Fig. 4-2)。pNEN142 で過剰発現させるため、*enoA142* プロモーターの下に変異 *Alcyp51A* 遺伝子を連結したプラスミド pNitrA を以下のように操作し準備した。pDAlcyp-T をテンプレートとして、P5 および P6 プライマーを使用した PCR によって変異 *Alcyp51A* を増幅し、増幅断片をゲル精製した。次に pNEN142 プラスミドを *PmaCI* で消化したものを精製した。

これら 2 つの DNA 断片を In-FusionCloning Kit (Takara Bio) を使用してライゲーションし、pNitrA を作成した。

野生型 *A. luchuensis* へイトラコナゾール耐性を導入した変異株を得るために使用されたプラスミド (pRitrA) は、以下のように作成された。*itrA* カセット (*enoA142* プロモーターおよび *agdA* ターミネーターを含む) を、pNitrA をテンプレートとして使用して P7 および P8 プライマーを使用し、PCR によって増幅した。大腸菌とアグロバクテリウムのバイナリーベクターである pRIE (9) を EcoRI 消化し精製した。この 2 つの産物を In-Fusion Cloning Kit を使用してライゲーションし、pRitrA を作成した。

Table 3. Primer sequence used in this chapter.

Primer	Sequence
P1	ttataaatcaaaagaatagcGTTGGAATGCCCTGAAATGAGCTGC
P2	agctaattcgagctcggtagcGCTGGCGCTCAGCCTCAGTGTT
P3	gaagcacaatcagctatAgaatggatccctacgcatt
P4	aatgcgtagggatccattcTatagctgattgtgcttc
P5	agcttgccggccgccacaaaATGGCATATCTTGCTGTCGCAGG
P6	gccatagactagtcacGTTCAAGGACCCCTTGGAGTTGTC
P7	cgttttaatgaattCTGGTCGCGTATCCAAGACGCAATTC
P8	agtttaaactgaattATGACCTCCTCCTACCCCACCATCC
P9	GTAGTAGCTCCGCTCTAACAGCCGTG
P10	GGTTTCGGTCGTCAAAGGTCTCATTTCGTG
P11	gcgatccaagacgcAATTCGAGCTCGGTACCCGGGAG
P12	cacgtctgagcgccATGACCTCCTCCTACCCCACCATC
P13	CCAAGACGCAATTCGAGCTCGGTACC
P14	TCCCTTTCCGTCTCTTTTCTTCCGTCCTCC

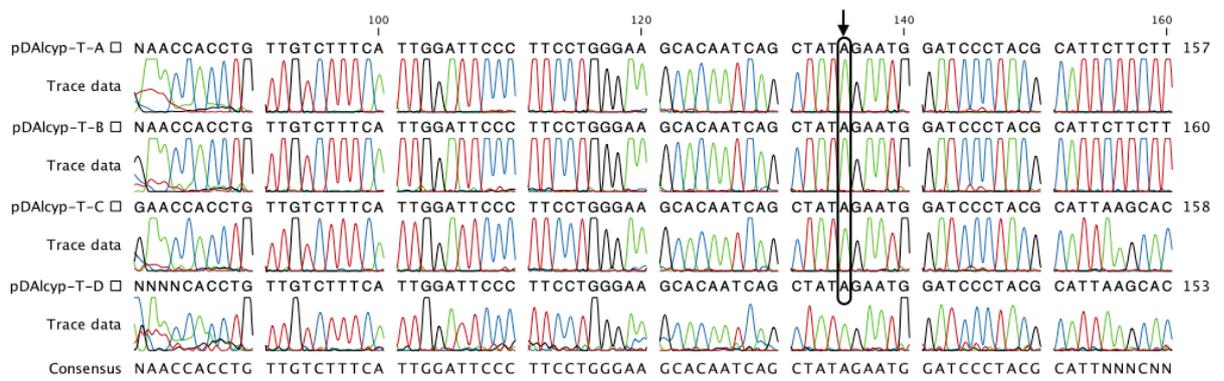


Fig. 4-2. Sequence confirmation of pDAIcyp-T plasmid by Sanger sequence. pDAIcyp-T-A to pDAIcyp-T-D are different plasmid that acquired after In-Fusion reaction. The arrow indicates a differentiation from wild-type strain.

黄麹菌イトラコナゾール耐性株の造成およびその確認

A. oryzae niaD300 株の形質転換は Gomi らによって記述されたプロトプラスト-PEG 法に従って操作した (19)。SgrAI で消化された pDAIcyp-T または pNitrA を用いて niaD300 株の形質転換を行った。*A. oryzae* 形質転換体は、1.2 M ソルビトールを含む CD プレート上で NO₃ 資化性を指標にセレクションした。形質転換体を CD プレート上で少なくとも 3 回継代培養して、単一核の菌株（ホモカリオン化した）を得た。さらに、前述の実験と同様の操作により *A. oryzae* の形質転換を行い、CD 培地の代わりにイトラコナゾール（10 μg/mL）と 1.2 M ソルビトールを含む M 培地でもセレクションを行った。形質転換体の候補株は、プライマーセット A（P9 および P10）および B（P11 および P12）を使用して、前述の方法 (11) により、コロニーPCR による確認を行った。消化された pDAIcyp-T または pNitrA はターゲットの *niaD* 遺伝子座に挿入されると、プライマーセット A を使用して 4.4 kb フラグメントが増幅され、プライマーセット B を使用して 3.3 kb フラグメントが増幅されるが、プライマーセット A によって 3.7 kb のフラグメントの増幅が得られた場合、プラスミドが非相同末端結合（NHEJ）経路を介した修復により *niaD* ターゲット以外の箇所に挿入されたか、または形質転換体がまだ異核性（ヘテロカリオン）であることが考えられる。

黒麹菌イトラコナゾール耐性株の造成および確認

Michielse ら (10) によるアグロバクテリウム法に従ってイトラコナゾール耐性マーカーカセットを含む pRitrA プラスミドを *A. luchuensis* NBRC4314 に導入した。*A. luchuensis* 形質転換体をイトラコナゾール (10 µg/mL) を含む培地で選抜し、プライマーP13 および P14 を用いたコロニーPCR によって確認した。また候補株は PCR と同時にイトラコナゾールを含む CD プレート上で継代培養した。イトラコナゾール耐性マーカーカセットが *A. luchuensis* NBRC4314 株のゲノムに非相同で挿入されると、P13, P14 プライマーを使用して 2.3 kb の PCR 産物が生成される。

第3節 結果と考察

A. luchuensis *cyp51A* 相同遺伝子の同定

A. luchuensis の *cyp51A* 遺伝子を取得するために、*A. fumigatus* Af293 株の Cyp51A (アクセッション番号 XP_752137) のアミノ酸配列を Query として *A. luchuensis* のゲノムに対して BLAST 検索した。その結果、*A. luchuensis* は 512 個のアミノ酸残基からなる単一の Cyp51A ホモログ (アクセッション番号 GAT22189) を持っていることが分かった (Fig. 4-3)。この遺伝子を *Alcyp51A* とした。また、*A. oryzae* のゲノムに対して *A. fumigatus* Af293 株の Cyp51A ホモログを検索すると、*A. oryzae* が 2 つの Cyp51A ホモログ (アクセッション番号 XP_001824687, XP_001819419) を持っていることを確認した。この結果は、Becher らによる *Aspergillus* 種の Cyp51A および B の系統分析からも示唆されていた (29)。さらに、AlCyp51A、XP_001824687、および XP_001819419 は、それぞれ *A. fumigatus* Cyp51A と 79.7%、77.1%、および 77.0% の identity を有していた。*Alcyp51A* は *A. luchuensis* ゲノムに存在する *A. fumigatus cyp51A* の単一のホモログであるため、*Alcyp51A* は、黒麹菌のエルゴステロール合成系において主要な 14- α -ステロールデメチラーゼとして *cyp51A* の役割を強く持っていることが示唆されるため、イトラコナゾール耐性遺伝子の作出に好適であると予想し、以後の実験において *Alcyp51A* をイトラコナゾール耐性マーカーの構築に利用した。

*A. oryzae*におけるイトラコナゾール耐性遺伝子 (*itrA*) の構築と *itrA* による形質転換

先行研究において、イトラコナゾール耐性をもった *A. fumigatus* の臨床単離株が保持する *cyp51A* 遺伝子がさまざまな変異を持っている事が示されている(30,31)。これらの耐性化へ寄与しているとされる変異アミノ酸である *A. fumigatus* の Cyp51A における 54 番目のグリシンは黒麹菌 Cyp51A にも保存されていることが野生型の *A. fumigatus* Cyp51A と AlCyp51A のアラインメント比較により明らかになったため、Cyp51A の G54R 変異の導入 (*A. luchuensis* における G52R) はイトラコナゾール耐性化に寄与すると考えられた (Fig. 4-4)。

Alcyp51A を使用してイトラコナゾール耐性遺伝子を生成するために、*AlCyp51A* の 52 番目のグリシンをコードするトリプレットを (GGG) からアルギニン (AGG) に変更した。次に、変異 *Alcyp51A* 遺伝子が *A. oryzae* でイトラコナゾール耐性遺伝子として機能するかどうか調べるため、変異 *Alcyp51A* を導入する形質転換を行った。まず、変異 *Alcyp51A* と野生型プロモーターを含む pDAlcyp-T プラスミドを SgrAI で消化し、プロトプラスト-PEG 法を使用して *A. oryzae* niaD300 株の *niaD* 部分 (*niaD300* 株は *niaD* を部分欠失している)に挿入した。これらの形質転換体を硝酸塩 (NO₃⁻) の資化能に基づいてスクリーニングし、P9, P10 プライマーを使用したコロニーPCR によって形質転換体の確認を行った (データ未掲載)。次に、これらの形質転換体がイトラコナゾール耐性を獲得したかどうかを確認する為に、これらの形質転換体を、イトラコナゾール (10 µg/mL) を含む CD プレートにスポット植菌した。その結果、イトラコ

ナゾール耐性は観察されなかった（データ未掲載）。また、先述の研究とは別に、*A. fumigatus cyp51A* の変異に加えて、*cyp51A* のプロモーター領域で 34 bp または 46 bp のタンデムリピートがアゾール耐性を引き起こすことが報告されていること (32) から、*cyp51A* 遺伝子の発現量もアゾール耐性に関与していることが示唆された。したがって、高発現のために *enoA142* プロモーター下に結合した変異 *Alcyp51A* を含む pNitrA プラスミドを構築し、*niaD300* 株の *niaD* 遺伝子座を標的とする遺伝子導入を行った (Fig. 4-5A)。これらの形質転換体は硝酸資化性に基づいてスクリーニングし、コロニーPCR によって同定した (Fig. 4-5B)。コロニーPCR の結果から No. 8 を除くすべての形質転換体は、プラスミドが *niaD* 部位に正しく組込まれたことが示された。*niaD* 部位への挿入が PCR で確認できた No.1-3 株はイトラコナゾールを含む M プレート上で生育したが、その親株である *A. oryzae niaD300* は生育しなかった (Fig. 4-5C)。これらの結果は、*Alcyp51A* の G52R 変異、およびその高発現の為にを行った野生型 *cyp51A* プロモーターの *enoA142* プロモーターへの置換が、*A. oryzae* でイトラコナゾール耐性を付与し、マーカーカセットとしてうまく機能したことを示唆している。このことより、プロモーター置換した領域を含む変異 *Alcyp51A* を *itrA* (イトラコナゾール耐性遺伝子) と名付けた。

優性選択マーカーとしての *itrA* 遺伝子による *A. oryzae* および *A. luchuensis* の形質転換

itrA 遺伝子カセットが *A. oryzae* の優性選択マーカーとして利用可能かどうかを調べるために、*A. oryzae* niaD300 株を、上記と同じプラスミドを使用して、イトラコナゾールを唯一の選択圧となる条件下で形質転換を行った。この形質転換に使用する pNitrA は、niaD300 株の *niaD* 遺伝子を標的として設計されたが、同時に選択用の培地をイトラコナゾールと唯一の N 源としてアンモニウムイオン（塩化アンモニウム、硫酸アンモニウム）を含む 1.2 M ソルビトールを含む M プレートで選抜を行うことで、niaD300 株のセレクションをイトラコナゾールで行うことを可能にしている。その結果、プレート上に多くの形質転換体が観察された (Fig. 4-6A)。これらの候補株は、P9 および P10 プライマーを使用してコロニーPCRによる確認を行った (Fig. 4-6B)。Fig. 4-6B に示すように、イトラコナゾールに耐性のある 15 株の形質転換候補のうち 10 株が、pNitrA プラスミドの *niaD* 遺伝子座への組込みが確認された。逆に、Fig. 4-6B のレーン 1、8、9、14、および 15 の株は、*A. oryzae* ゲノム上への非相同末端結合修復経路による組込みによりイトラコナゾール耐性を獲得したと予測された為、これらの形質転換体について P11 および P12 プライマーを使用した PCR による *itrA* 遺伝子カセットの存在の確認を行った。この PCR ではイトラコナゾール耐性に関わる挿入遺伝子部分であるマーカー領域を増幅してイトラコナゾール耐性遺伝子の確認を行った (Fig. 4-6C)。マーカーカセットがゲノムに存在する場合、3.3 kb のバンドが観察され、5 つの形質転換体はすべてが 3.3 kb のバンドを示し

(Fig. 4-6C)、*itrA* 遺伝子カセットの非相同挿入を確認できた。さらに、これらの菌株は CD プレート上で増殖できなかった (データ未掲載)。これらのことより、*itrA* 遺伝子カセットは *A. oryzae* のイトラコナゾール耐性マーカーとして利用可能であることが明らかとなった。

itrA 遺伝子カセットのランダムな組込みが *A. oryzae* でイトラコナゾール耐性を付与したので、*A. oryzae* 以外の糸状菌においてもイトラコナゾール耐性を付与できるか確認する為、アグロバクテリウム法による *A. luchuensis* NBRC4314 株への *itrA* 遺伝子カセット導入を行った。その結果、イトラコナゾールを含む M プレート上に多数のコロニーが観察された。いくつかのコロニー (そのうち 13 株) は、P13, P14 プライマーを使用したコロニーPCR によって確認された。*itrA* 遺伝子カセットの組み込みは 5 つの株で観察され (Fig. 4-7A)、それらはイトラコナゾールを含む M プレートに継代培養することができた (Fig. 4-7B)。逆に、P13, P14 プライマーを利用した PCR による確認で、バンドの確認できない株はプレート上で生育しなかった (データ未掲載)。これらの結果から、*itrA* 遺伝子カセットが *A. luchuensis* のイトラコナゾール耐性マーカーとしても利用可能であることが示唆された。

この章ではイトラコナゾールに対する耐性を付与するマーカー遺伝子の開発を行った。*A. luchuensis* *AlCyp51A* の G52R 変異と、野生型プロモーターの高発現プロモーター (*enoA142*) 置換が、*A. oryzae* などの *Aspergillus* 属糸状菌のイトラコナゾール耐性に寄与することを示した。はじめに、マーカーの構築には臨床単離株におけるアゾール耐性株 (耐性化株) に由来する *A. fumigatus*

Cyp51A および Cyp51B の変異部位をシーケンスによる確認を行った結果が入手可能なデータであったため (30,31,33–35)、これらのデータを参照してアゾール耐性マーカーの作成を試みた。イトラコナゾールの耐性化付与には様々なアプローチが考えられるが、そのうち *A. luchuensis* の *cyp51A* を利用し、改変することで *A. oryzae* と *A. luchuensis* で利用可能な形質転換用のマーカーを作出した。Diaz-Guerra らによる *A. fumigatus* のイトラコナゾール耐性を持った臨床単離株の *cyp51A* および *cyp51B* の変異をシーケンスした結果(36)から *cyp51A* における Codon 54 および Codon 236 の変異、*cyp51B* における Codon 35, 42, 187, 387 および Codon 394 の変異がイトラコナゾールを含む各種アゾールに対する感受性と関連性があることが示唆されており、このうち *cyp51A* の Codon 54 をコードする塩基配列が GGG (グリシン) から AGG (アルギニン) へ変異した場合、イトラコナゾールに対する MIC が 0.5 µg/mL から >8 µg/mL へと変化しており、その他のアゾール化合物への感受性は変化していなかった。本研究におけるイトラコナゾール耐性マーカー遺伝子についても同様な変異を導入しているほか、プロモーター置換により、変異導入 *Alcyp51A* の発現が促進されるようにデザインされている。

これらは、*A. luchuensis* の栄養要求性変異株は依然として育種されていない為、*itrA* マーカーカセットは *A. luchuensis* のさらなる分子生物学的研究に役立つと考えられる。さらに、*A. oryzae* は *A. luchuensis* に比べてハイグロマイシンなどの抗真菌薬に対する耐性が高いため、本研究に用いたイトラコナゾール耐

性を付与する新規マーカーカセットは薬剤によるポジティブセレクションで用いることのできる有用なマーカーであることが示された。

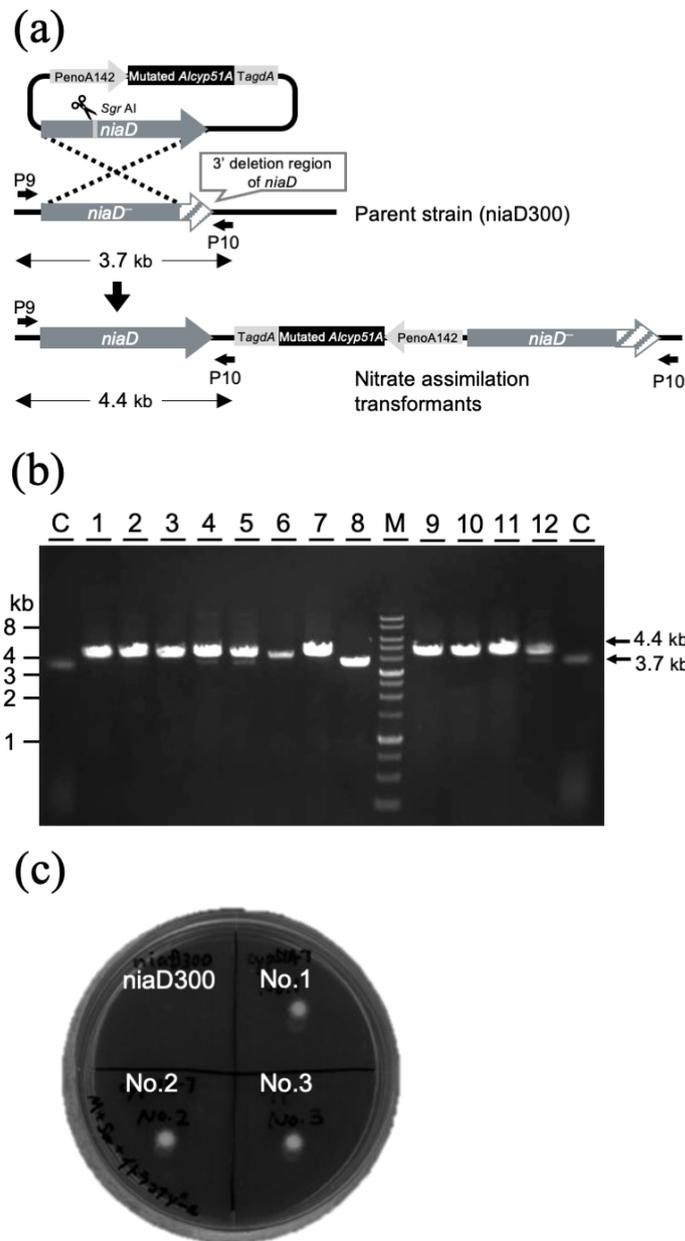


Fig. 4-5. Construction of a nitrate assimilation transformant in *A. oryzae* niaD300 as a host and the phenotype to itraconazole. (a) Scheme of the transformation using pNitrA in *A. oryzae* niaD300. The hatched area indicates a deletion region at the 3' end of *niaD* in the *A. oryzae* niaD300 genome. Arrows indicate the position of the primer annealing for confirmation of nitrate assimilation transformants. (b) Agarose gel electrophoresis of the P9 and P10 primer amplified regions. The *A. oryzae* niaD300 parent-strain is shown in lane C. *A. oryzae* transformants are shown in lanes 1–12. The wild type strain showed a 3.7-kb band and the transformant showed a 4.4-kb band. (c) *A. oryzae* niaD300 and transformants no. 1, 2, and 3 cells (1×10^4) with pNitrA were cultured on M agar plates containing itraconazole (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) at 30°C for 3 days.

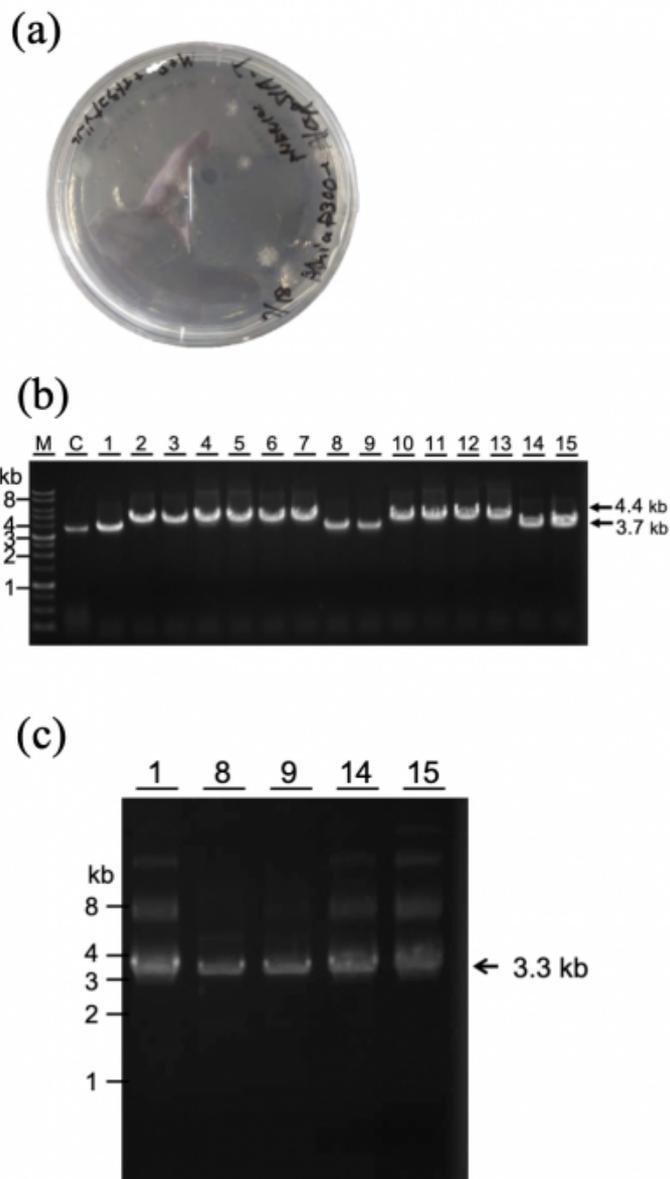


Figure 4-6. Transformation using the *itrA* gene cassette as a dominant selectable marker in *A. oryzae*. (a) Growth of transformants with pNitrA on M agar plates containing itraconazole at 30°C for 7 days. (b) Agarose gel electrophoresis of PCR-amplified fragments from the *niaD* target region in transformants. A parent-strain, *niaD300*, is shown in lane C. Candidates are shown in lanes 1–15. The wild type showed a 3.7-kb band and the transformant showed 4.4-kb. (c) Agarose gel electrophoresis of the PCR-amplified fragment from the *itrA* gene cassette region in transformants no.1, 8, 9, 14, and 15, which were not amplified at the *niaD* region in Figure 3(b).

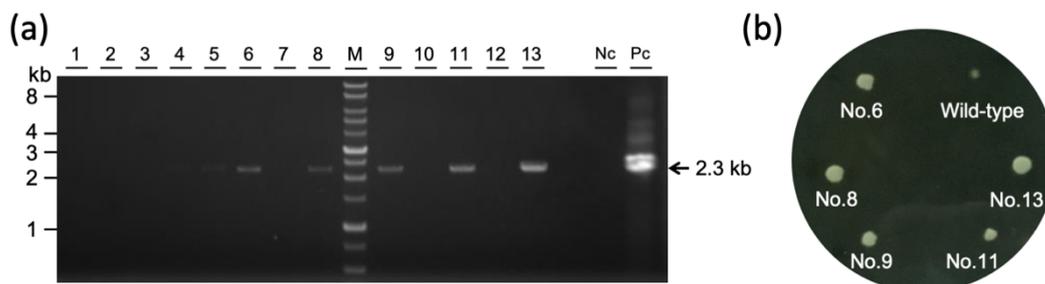


Fig. 4-7. Construction of the itraconazole resistance strain in *A. luchuensis*. (a) Agarose gel electrophoresis of the PCR fragment from the *itrA* marker cassette region in transformants. Lane Pc indicates a positive control using the pRitrA plasmid. Lanes Nc indicate negative controls using *A. luchuensis* genome (parent strain) as a template, respectively. Candidates transformed with pRitrA are shown in lanes 1–13. (b) *A. luchuensis* NBRC4314 and transformants no. 6, 8, 9, 11, and 13 cells (1×10^5) with pRitrA were cultured on M agar plates containing itraconazole (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) at 30°C for 2 days.

第5節 小括

糸状菌のエルゴステロール合成系に属する Cyp51A の変異はアゾール耐性を引き起こす要因とされ、プロモーター置換を含む黒麹菌由来 *cyp51A* の変異遺伝子である *itrA* は黄麹菌へイトラコナゾール耐性を付与することができた。また、同じく黒麹菌へアグロバクテリウム法を介した導入についても耐性株を取得することができた。

総括

Aspergillus 属は広く醸造に使われている糸状菌である。醤油や味噌、清酒の製造で用いられる黄麹菌 *Aspergillus oryzae*、沖縄の泡盛や九州の焼酎などで用いられる黒麹菌 *Aspergillus luchuensis*、およびその白色変異株である *A. luchuensis* mut. *kawachii* は、日本醸造協会より「国菌」として認定されている。それぞれの麹菌は菌体外に分泌する酵素の活性や至適 pH、クエン酸排出の有無などの特徴が異なり、目的に応じて様々な食品や薬品の製造などで用いられている。黄麹菌 *A. oryzae* の分子生物学研究は早期に形質転換系が確立された大腸菌と酵母に遅れたものの、1990 年代までには形質転換系が確立された。しかしながら、同じ *Aspergillus* 属に属する黒麹菌 *A. luchuensis* (*A. awamori*) の形質転換系は 2000 年を過ぎてもなお確立されてこなかった。これは他の糸状菌で広く利用されてきた形質転換法であるプロトプラスト-PEG 法が、同様な手法を用いても黒麹菌では、プロトプラスト形成が困難であったことに起因する。2008 年の Michielse らによる *A. awamori* のアグロバクテリウム法による形質転換法の報告(10) により黒麹菌の形質転換が可能になった。アグロバクテリウム法は本研究においても利用された重要な形質転換法のひとつである。本研究では黒麹菌の形質転換系を他の麹菌と同じくプロトプラスト-PEG によって行うことを大きな目的とした。これには単に形質転換法のバリエーションを拡張するだけでなく、アグロバクテリウム法では難しい手法をプロトプラスト-PEG 法の得意な手法を活用する事で可能になるといったメリットがある。黒麹菌のプロトプラスト化は Yatalase のみでは調製が極めて難しく、Yatalase と α -1,3-

glucanase を併用すると形質転換可能なプロトプラストを調製できることが判明した。また、Yatalase だけでなく α -1,3-glucanase をプロトプラスト化に必要とすることから、黒麹菌の細胞壁表層多糖が他の麹菌と比較して α -1,3-glucan に富むことや、 α -1,3-glucan 自体の合成量などの差異が示唆された。以上のことより、黒麹菌のプロトプラスト化は α -1,3-glucanase の併用により、促進されていると考えられたため、 α -1,3-glucanase の作用基質である α -1,3-glucan を合成する酵素の構造遺伝子である *ags* の影響が考えられた。よって、黒麹菌の α -1,3-glucan 合成遺伝子の 1 つであり、主要な α -1,3-glucan 合成遺伝子と推定される *agsE* 遺伝子を欠失させた株 (Δ *agsE*) を造成した。 Δ *agsE* 株の液体培養菌体は振盪培養時の凝集が抑えられ、Yatalase 単独でも容易にプロトプラストを生成することができた。また、 Δ *agsE* 株より得られたプロトプラストは形質転換可能なコンピテンシーを持つことが *agsE* の相補実験によって確認され、同時に相補株の Yatalase によるプロトプラスト化の難化が確認された。このことから黒麹菌の *agsE* が Yatalase によるプロトプラスト形成を阻害していることが明らかとなった。黒麹菌ゲノム中には 5 つの *ags* ホモログが確認されており、*agsE* 以外の *ags* 遺伝子にどのような機能があるのかは分かっておらず、今後これらの機能が明らかにされることで黒麹菌特有の細胞壁機能や生体防御システムの解明に繋がると考えられる。

本研究により、黒麹菌 Δ *agsE* 株を宿主に用いれば、容易にプロトプラスト-PEG 法により形質転換が可能となった。また、*agsE* 機能相補用プラスミドを用いることで、*agsE* を元に戻すことが可能となり、 Δ *agsE* 株を宿主に研究を行うこと

で考えられる *agsE* の欠損の影響を排除できる。そのため、これらのセットを用いた黒麹菌の分子生物学的研究の大きな進展が期待された。一方で、 Δ *agsE* 株の造成や *agsE* の機能相補により黒麹菌で利用可能な薬剤耐性マーカーを使用しているため、新たな薬剤耐性マーカーの開発が必要となった。加えて、黄麹菌においては、薬剤耐性マーカーが黒麹菌と比較して、非常に少ないことが問題となっていた。そこで本研究では、黒麹菌及び黄麹菌で使用可能な抗真菌剤のアゾール化合物であるイトラコナゾールとその耐性遺伝子の作出も行った。これにより、黒麹菌と黄麹菌の両株において同一のマーカー遺伝子を利用して形質転換体のセレクションを行うことができるようになった。アゾール耐性化の機序としては主に、薬剤排出能を高める、*cyp51* の変異、*cyp51* 上流の変異があるが、このうち ABC-transporter (AtrA, AtrG) の排出能をプロモーター置換により高め、アゾール耐性を作り出すことが黄麹菌においてなされ(37)、*cyp51* 変異と上流配列の変化に起因するアゾール耐性化に関しては *A. fumigatus* を含む病原性のある糸状菌においてなされている。後者に関して、*A. fumigatus* が肺アスペルギルス症と関係することや(38,39)、植物病原性糸状菌の防除の為に使用するステロール脱メチル化酵素阻害剤 (DMI 剤) が糸状菌のアゾール耐性化と深く関わる(40,41)ことから研究の対象とされているが、同じ *Aspergillus* 属糸状菌である黒麹菌ではこれらの知見に乏しかった。本研究で利用されたイトラコナゾール耐性を指標とするマーカー遺伝子の中身である *cyp51A* は *A. fumigatus* において G54R の変異以外にも他の変異箇所が見つかっており、変異箇所によって抵抗を示すアゾール化合物に変化が見られている。本研究で作出

したイトラコナゾール耐性株をアゾール化合物の一種であるボリコナゾールを含有する培地にスポット植菌したが、ボリコナゾールの終濃度が 1-20 $\mu\text{g/mL}$ の範囲内では親株と同様の生育を示し、ボリコナゾール耐性は示さなかった。これらの知見を利用することで薬剤と耐性マーカのバリエーションを増やす事ができると考えられる。

アゾール化合物への耐性機序には *cyp51A* への変異が無くとも耐性化が生じる例もあるものの、今後このマーカを活用した麴菌の分子生物学実験を行うことでより一層麴菌への理解が深まると考えられる。

引用文献

1. 北本勝ひこ. 麹菌物語. In: 生物工学基礎講座 バイオよもやま話. 2012. p. 424–7.
2. Machida M, Asai K, Sano M, Tanaka T, Kumagai T, Terai G, et al. Genome sequencing and analysis of *Aspergillus oryzae*. *Nature* [Internet]. 2005 Dec 22 [cited 2016 Feb 16];438(7071):1157–61. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nature04300>
3. Tominaga M, Lee Y-H, Hayashi R, Suzuki Y, Yamada O, Sakamoto K, et al. Molecular analysis of an inactive aflatoxin biosynthesis gene cluster in *Aspergillus oryzae* RIB strains. *Appl Environ Microbiol* [Internet]. 2006 Jan 1 [cited 2016 Feb 16];72(1):484–90. Available from: <http://aem.asm.org/cgi/content/long/72/1/484>
4. Yu J, Chang P-K, Ehrlich KC, Cary JW, Bhatnagar D, Cleveland TE, et al. Clustered Pathway Genes in Aflatoxin Biosynthesis. *Appl Environ Microbiol* [Internet]. 2004 Mar 1 [cited 2016 Feb 16];70(3):1253–62. Available from: <http://aem.asm.org/cgi/content/long/70/3/1253>
5. Yamada O, Machida M, Hosoyama A, Goto M, Takahashi T, Futagami T, et al. Genome sequence of *Aspergillus luchuensis* NBRC 4314. *DNA Res* [Internet]. 2016 Dec 20 [cited 2016 Oct 3];23(6):507–15. Available from: <http://dnaresearch.oxfordjournals.org/content/early/2016/09/20/dnares.dsw032.fu>

6. Hong SB, Lee M, Kim DH, Varga J, Frisvad JC, Perrone G, et al. *Aspergillus luchuensis*, an Industrially Important Black *Aspergillus* in East Asia. PLoS One. 2013;8(5).
7. Yamada O, Takara R, Hamada R, Hayashi R, Tsukahara M, Mikami S. Molecular biological researches of Kuro-Koji molds, their classification and safety. J Biosci Bioeng. 2011 Sep;112(3):233–7.
8. 渡邊泰祐. 新しい黒麹菌の産業利用に向けて (バイオメディア). 生物工学会誌. 2014;92(8):446.
9. Takahashi T, Mizutani O, Shiraishi Y, Yamada O. Development of an efficient gene-targeting system in *Aspergillus luchuensis* by deletion of the non-homologous end joining system. J Biosci Bioeng. 2011 Dec;112(6):529–34.
10. Michielse CB, J Hooykaas PJ, J J van den Hondel CAM, J Ram AF. Agrobacterium-mediated transformation of the filamentous fungus *Aspergillus awamori*. Nat Protoc. 2008 Oct;3(10):1671–8.
11. Mizutani O, Masaki K, Gomi K, Iefuji H. Modified Cre-loxP Recombination in *Aspergillus oryzae* by Direct Introduction of Cre Recombinase for Marker Gene Rescue. Appl Environ Microbiol. 2012 Jun 15;78(12):4126–33.
12. Pohl C, Kiel JAKW, Driessen AJM, Bovenberg RAL, Nygård Y. CRISPR/Cas9 Based Genome Editing of *Penicillium chrysogenum*. ACS Synth Biol. 2016 Jul 15;5(7):754–64.

13. Tokashiki J, Hayashi R, Yano S, Watanabe T, Yamada O, Toyama H, et al. Influence of α -1,3-glucan synthase gene *agsE* on protoplast formation for transformation of *Aspergillus luchuensis*. J Biosci Bioeng. 2019 Aug 1;128(2):129–34.
14. Gardiner DM, Kazan K. Selection is required for efficient Cas9-mediated genome editing in *Fusarium graminearum*. Fungal Biol. 2018 Feb;122(2–3):131–7.
15. Sambrook JF, Russell DW. Molecular cloning: a laboratory manual, volume 1, 2, 3. New York: Press, Cold Spring Harbour; 2001.
16. Tashiro S, Futagami T, Wada S, Kajiwara Y, Takashita H, Omori T, et al. Construction of a *ligD* disruptant for efficient gene targeting in white koji mold, *Aspergillus kawachii*. J Gen Appl Microbiol. 2013;59(3):257–60.
17. Yano S, Yamamoto S, Toge T, Wakayama M, Tachiki T. Occurrence of a specific protein in basidiomycete-lytic enzyme preparation produced by *Bacillus circulans* KA-304 inductively with a cell-wall preparation of *Schizophyllum commune*. Biosci Biotechnol Biochem. 2003;
18. YANO S, RATTANAKIT N, WAKAYAMA M, TACHIKI T. Cloning and Expression of a *Bacillus circulans* KA-304 Gene Encoding Chitinase I, Which Participates in Protoplast Formation of *Schizophyllum commune*. Biosci Biotechnol Biochem. 2005 Jan 22;69(3):602–9.

19. GOMI K, IIMURA Y, HARA S. Integrative transformation of *Aspergillus oryzae* with a plasmid containing the *Aspergillus nidulans argB* gene. *Agric Biol Chem.* 1987;51(9):2549–55.
20. Ward M, Wilson LJ, Carmona CL, Turner G. The *oliC3* gene of *Aspergillus niger*: isolation, sequence and use as a selectable marker for transformation. *Curr Genet.* 1988 Jul;14(1):37–42.
21. Mizutani O, Nojima A, Yamamoto M, Furukawa K, Fujioka T, Yamagata Y, et al. Disordered cell integrity signaling caused by disruption of the *kexB* gene in *Aspergillus oryzae*. *Eukaryot Cell.* 2004 Aug;3(4):1036–48.
22. Yoshimi A, Sano M, Inaba A, Kokubun Y, Fujioka T, Mizutani O, et al. Functional analysis of the α -1,3-glucan synthase genes *agsA* and *agsB* in *Aspergillus nidulans*: *agsB* is the major α -1,3-glucan synthase in this fungus. *PLoS One.* 2013 Jan 24;8(1):e54893.
23. Fontaine T, Beauvais A, Loussert C, Thevenard B, Fulgsang CC, Ohno N, et al. Cell wall α 1-3glucans induce the aggregation of germinating conidia of *Aspergillus fumigatus*. *Fungal Genet Biol.* 2010 Aug;47(8):707–12.
24. Zhang S, Sato H, Ichinose S, Tanaka M, Miyazawa K, Yoshimi A, et al. Cell wall α -1,3-glucan prevents α -amylase adsorption onto fungal cell in submerged culture of *Aspergillus oryzae*. *J Biosci Bioeng.* 2017 July; 124(1):47-53
25. Miyazawa K, Yoshimi A, Zhang S, Sano M, Nakayama M, Gomi K, et al. Increased enzyme production under liquid culture conditions in the industrial

- fungus *Aspergillus oryzae* by disruption of the genes encoding cell wall α -1,3-glucan synthase. *Biosci Biotechnol Biochem*. 2016 Sep 21;80(9):1853–63.
26. Damveld RA, Vankuyk PA, Arentshorst M, Klis FM, Van Den Hondel CAMJJ, Ram AFJ. Expression of *agsA*, one of five 1,3- α -d-glucan synthase-encoding genes in *Aspergillus niger*, is induced in response to cell wall stress. *Fungal Genet Biol*. 2005 Feb 1;42(2):165–77.
 27. Minetoki T, Nunokawa Y, Gomi K, Kitamoto K, Kumagai C, Tamura G. Deletion analysis of promoter elements of the *Aspergillus oryzae agdA* gene encoding α -glucosidase. *Curr Genet*. 1996 Nov;30(5):432–8.
 28. Tsuboi H, Koda A, Toda T, Minetoki T, Hirotsune M, Machida M. Improvement of the *Aspergillus oryzae* enolase promoter (P-*enoA*) by the introduction of cis-element repeats. *Biosci Biotechnol Biochem*. 2005 Jan 22;69(1):206–8.
 29. Becher R, Weihmann F, Deising HB, Wirsel SGR. Development of a novel multiplex DNA microarray for *Fusarium graminearum* and analysis of azole fungicide responses. *BMC Genomics*. 2011 January; 12(52)
 30. Mellado E, Garcia-Effron G, Alcazar-Fuoli L, Melchers WJG, Verweij PE, Cuenca-Estrella M, et al. A new *Aspergillus fumigatus* resistance mechanism conferring in vitro cross-resistance to azole antifungals involves a combination of *cyp51A* alterations. *Antimicrob Agents Chemother*. 2007 Jun 1;51(6):1897–904.
 31. Diaz-Guerra TM, Mellado E, Cuenca-Estrella M, Rodriguez-Tudela JL. A point mutation in the 14 α -sterol demethylase gene *cyp51A* contributes to

- itraconazole resistance in *Aspergillus fumigatus*. Antimicrob Agents Chemother. 2003 Mar;47(3):1120–4.
32. Alvarez-Moreno C, Lavergne R-A, Hagen F, Morio F, Meis JF, Le Pape P. Azole-resistant *Aspergillus fumigatus* harboring TR34/L98H, TR46/Y121F/T289A and TR53 mutations related to flower fields in Colombia. Nat Publ Gr. 2017;7(45631)
33. Chen J, Li H, Li R, Bu D, Wan Z. Mutations in the *cyp51A* gene and susceptibility to itraconazole in *Aspergillus fumigatus* serially isolated from a patient with lung aspergilloma. J Antimicrob Chemother. 2005 Jan 1;55(1):31–7.
34. Mann PA, Parmegiani RM, Wei S-Q, Mendrick CA, Li X, Loebenberg D, et al. Mutations in *Aspergillus fumigatus* Resulting in Reduced Susceptibility to Posaconazole Appear To Be Restricted to a Single Amino Acid in the Cytochrome P450 14-Demethylase. Antimicrob Agents Chemother. 2003;47(2):577–81.
35. Nascimento AM, Goldman GH, Park S, Marras SAE, Delmas G, Oza U, et al. Multiple Resistance Mechanisms among *Aspergillus fumigatus* Mutants with High-Level Resistance to Itraconazole. Antimicrob Agents Chemother. 2003;47(5):1719–26.
36. Diaz-Guerra TM, Mellado E, Cuenca-Estrella M, Rodriguez-Tudela JL. A Point Mutation in the 14 α -Sterol Demethylase Gene *cyp51A* Contributes to Itraconazole Resistance in *Aspergillus fumigatus*. Antimicrob Agents Chemother. 2003 Mar;47(3):1120–4.

37. Miura D, Sugiyama K, Ito A, Ohba-Tanaka A, Tanaka M, Shintani T, et al. The PDR-type ABC transporters AtrA and AtrG are involved in azole drug resistance in *Aspergillus oryzae*. *Biosci Biotechnol Biochem*. 2018 Oct 3;82(10):1840–8.
38. Tashiro M, Izumikawa K, Minematsu A, Hirano K, Iwanaga N, Ide S, et al. Antifungal susceptibilities of *Aspergillus fumigatus* clinical isolates obtained in Nagasaki, Japan. *Antimicrob Agents Chemother*. 2012 Jan 1;56(1):584–7.
39. Kikuchi K, Watanabe A, Ito J, Oku Y, Wuren T, Taguchi H, et al. Antifungal susceptibility of *Aspergillus fumigatus* clinical isolates collected from various areas in Japan. *J Infect Chemother*. 2014 May 1;20(5):336–8.
40. Schnabel G, Jones AL. The 14 α -Demethylase(CYP51A1) Gene is Overexpressed in *Venturia inaequalis* Strains Resistant to Myclobutanil. *Phytopathology*. 2001 Jan;91(1):102–10.
41. Délye C, Bousset L, Corio-Costet MF. PCR cloning and detection of point mutations in the eburicol 14 α -demethylase (CYP51) gene from *Erysiphe graminis* f. Sp. *hordei*, a “recalcitrant” fungus. *Curr Genet*. 1998;34(5):399–403.

謝辞

本研究を遂行するにあたり、終始ご指導ご鞭撻を賜りました琉球大学農学部の水谷治 准教授ならびに外山博英 教授に深甚なる感謝の意を示します。また、本論文の審査ならびにご指導、ご助言を賜りました鹿児島大学大学院連合農学研究科の泰基 准教授に深く感謝申し上げます。さらに、ご助言、ご支援いただきました日本大学生物資源科学部の渡邊泰祐 准教授、山形大学大学院理工学研究科の矢野成和 准教授、酒類総合研究所の山田修 部門長、林梨咲 氏に厚く御礼申し上げます。最後に、本論文の審査ならびにご校閲くださいました佐賀大学農学部の後藤正利 教授と琉球大学農学部の前良東紀 教授深く感謝申し上げます。